

Die Abstammung von Fibrozyten und ihre Bedeutung bei der Entstehung einer Nierenfibrose

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

- Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg -



vorgelegt von

Marianne Niedermeier

Regensburg im Juni 2009

Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

22. Juni 2009

Promotionskolloquium:

15. September 2009

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. R. Warth

Prof. Dr. M. Mack

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. S. Schneuwly
1. Gutachter:	Prof. Dr. R. Warth
2. Gutacher:	Prof. Dr. M. Mack
3. Prüfer:	Prof. Dr. Dr. H.R. Kalbitzer

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 2005 bis Juni 2009 in der
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Klinikums der Universität Regensburg

per aspera ad astra

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1 PATHOMECHANISMUS DER RENALE FIBROSE	5
1.2 KOLLAGEN-PRODUZIERENDE ZELLEN IN DER NIERE	6
1.2.1 FIBROBLASTEN UND MYOFIBROBLASTEN	6
1.2.2 FIBROZYTEN	6
1.2.2.1 Hämatopoietischer Ursprung und mesenchymale Eigenschaften von Fibrozyten	7
Phänotyp	7
Fibrozytendifferenzierung	7
Fibrozytenwanderung	9
Eigenschaften und Funktion	10
1.2.2.2 Fibrozyten im Tiermodell	11
Abstammung der Fibrozyten aus dem Knochenmark	11
Differenzierung von Fibrozyten aus Vorläuferzellen	11
Migration	12
Zusammenhang von Fibrozytenanreicherung und Gewebsfibrose	13
1.2.2.3 Fibrozyten und ihre Beteiligung an humanen Erkrankungen	14
Fibrozyten und ihre Rolle bei hypertropher Narbenbildung und Keloiden	14
Fibrozyten und ihre Rolle bei asthmatischen Erkrankungen	15
Fibrozyten und ihre Rolle bei interstitieller pulmonaler Fibrose	16
Fibrozyten und ihre Rolle bei der nephrogenen systemischen Fibrose	17
1.2.3 FIBROZYTEN IN DER NIERE	18
1.3 DIE ROLLE VON CD4⁺ T-ZELLEN AN DER FIBROSE	20
1.3.1 SIGNALTRANSDUKTION VON CD4 ⁺ T-ZELLEN	20
1.3.2 CALCINEURIN-INHIBITOREN UND IHRE WIRKUNG AUF CD4 ⁺ T-ZELLEN	21
1.4 ZIELSETZUNG	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE	24
2.1.1 GERÄTE	24
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND PLASTIKARTIKEL	25
2.1.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	26
2.1.4 PUFFER, ZELLKULTURMEDIENTEN UND ZUSÄTZE	28
2.1.5 PEPTIDE UND STIMULANZIEN	30
2.1.6 ANTIKÖRPER	30
Primäre Antikörper für FACS, ELISA, Western-Blot, Immunhistologie und Zellkultur	30
Sekundäre Antikörper und Isotypkontrollen	31
2.1.7 MICROBEADS	32
2.1.8 ENZYME	32

2.1.9	KITS	32
2.1.10	PRIMERSEQUENZEN	32
2.1.11	SOFTWARE	33
2.2	METHODEN	34
2.2.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	34
2.2.1.1	Präparation von Zellsuspensionen	34
2.2.1.2	Präparation von murinen Splenozyten	34
2.2.1.3	Präparation von murinen Nierenzellen für die FACS-Analyse	34
2.2.1.4	Präparation von murinem Nieren- und Milzgewebe für RNA- und Proteinisolation und Kryoschnitten	35
2.2.1.5	Magnetische Zellseparation	35
2.2.1.6	Aufreinigung und Ausschluss von T- und B-Zellen	35
2.2.1.7	Aufreinigung und Ausschluss von Monozyten	36
2.2.1.8	Aufreinigung von CD45 ⁺ Zellen aus Nieren- und Milzgewebe	37
2.2.1.9	Zellkultur	37
2.2.1.10	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	37
2.2.1.11	Kultivierung von Fibrozyten	38
2.2.1.12	Herstellung von Überständen aktivierter CD4 ⁺ T-Zellen	38
2.2.2	BESTIMMUNG DER FIBROZYTENZAHL	39
2.2.3	ANTIKÖRPERFÄRBUNG	39
2.2.3.1	Oberflächenfärbung	39
2.2.3.2	Intrazelluläre Färbung	40
2.2.3.3	Färbung von kultivierten Fibrozyten	40
2.2.3.4	Färbung von Fibrozyten aus frischem Gewebe	41
2.2.4	FLUORESCENZ-AKTIVIERTE-ZELLSORTIERUNG/DURCHFLUSSZYTOMETRIE	41
	Allgemeines Prinzip	41
2.2.5	ELISA (ENZYMIMMUNOASSAY)	43
2.2.5.1	Nachweis von intrazellulärem Kollagen I im Zelllysate von Fibrozyten per ELISA	44
2.2.5.2	Nachweis von sezerniertem Kollagen I in der Kulturplatte per ELISA	45
2.2.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	46
2.2.6.1	RNA-Isolation	46
2.2.6.2	Reverse Transkription	47
2.2.6.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)	47
2.2.6.4	Protein-Isolation	49
2.2.6.5	Proteingehaltsbestimmung	49
2.2.6.6	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.2.6.7	Detektion von Kollagen I mit Hilfe monoklonaler Antikörper im Western-Blot	51
2.2.7	VERSUCHSTIERE	52
2.2.8	EINSEITIGE URETERLIGATUR (<i>UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION, UUO</i>)	52
2.2.8.1	Behandlung von UUO-Mäusen mit Interleukin-2 und Tumor Necrosis Faktor- α	53
2.2.8.2	Behandlung von UUO-Mäusen mit Cyclosporin A und anti-CD3	54
2.2.9	HERSTELLUNG HISTOLOGISCHER SCHNITTE AUS KRYOKONSERVIERTEM GEWEBE	55
2.2.10	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON KOLLAGEN I	55

3. ERGEBNISSE	57
3.1 ZELLULÄRER URSPRUNG VON MURINEN FIBROZYTEN	57
3.2 BEDINGUNGEN, DIE DIE FIBROZYTENDIFFERENZIERUNG UNTERSTÜTZEN	61
3.3 GESTEIGERTE ENTWICKLUNG VON FIBROZYTEN DURCH GADOLINIUM	68
3.4 DER EINFLUSS VON T-ZELL-ZYTOKINEN AUF DIE ENTWICKLUNG VON FIBROZYTEN	70
3.5 IL-2 UND TNF- α VERMINDERN DIE ZAHL DER FIBROZYTEN UND DEN UMFANG EINER NIERENFIBROSE <i>IN VIVO</i>	78
3.6 EINFLUSS VON CD4 ⁺ T-ZELLEN AUF FIBROZYTEN <i>IN VIVO</i>	86
3.7 EINFLUSS VON CYCLOSPORIN A UND RAPAMYCIN AUF FIBROZYTEN UND NIERENFIBROSE <i>IN VIVO</i>	88
4. DISKUSSION	94
5. ZUSAMMENFASSUNG	100
6. ABKÜRZUNGEN	102
7. LITERATURVERZEICHNIS	106
8. ANHANG	114
8.1 DANKSAGUNG	114
8.2 PUBLIKATIONEN	116
8.3 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	117

1. Einleitung

1.1 Pathomechanismus der renale Fibrose

Gemeinsame Endstrecke verschiedener progredienter Nierenerkrankungen ist die Entwicklung einer Nierenfibrose, die schließlich zum terminalen Nierenversagen führt. Dabei korreliert die Zunahme des Narbengewebes eng mit der renalen Funktionseinschränkung (1).

Bei der Entwicklung einer Fibrose kommt es allgemein zu einer Vermehrung des Bindegewebes innerhalb eines betroffenen Organs, was zu einer zunehmenden Verhärtung und Vernarbung mit konsekutiver Verdrängung der für die Organfunktion spezifischen Zellen führt und schließlich den Funktionsverlust des Gesamtorgans bedingt. In dem so entstehenden Bindegewebe machen die extrazellulären Bestandteile einen großen Anteil aus, wobei man die Matrixkomponenten des extrazellulären Raumes als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet. Die fortschreitende Expansion extrazellulärer Matrix in der Niere findet sich als uniforme Gewebsantwort auf verschiedenartige Schädigungsreize wie Hypertension, Hyperglykämie oder inflammatorische Reaktionen. Der Grad der Schädigung hängt hierbei von der Häufigkeit, der Dauer und der Schwere des Schädigungsreizes ab, wobei sich ähnliche Gewebsantworten bei einer Vielzahl chronisch-progressiver Erkrankungen wie z.B. der Lungenfibrose, der Leberzirrhose und der Myokardfibrose finden. Auch bei diesen Erkrankungen geht die zunehmende Fibrosierung des Organs mit einem Funktionsverlust einher. Unter physiologischen Bedingungen handelt es sich bei der Matrixakkumulation um einen Reparaturversuch des Gewebes im Rahmen der regenerativen Wundheilung, mit dem Ziel der Normalisierung der Organfunktion. Der Reparaturprozess ist dabei auf den Ort der Schädigung begrenzt und es herrscht ein Gleichgewicht zwischen Matrixakkumulation und Matrixdegradation. Unter pathologischen Bedingungen chronisch-progressiver Nierenerkrankungen ist dieses Gleichgewicht gestört und es kommt zu einer Defektheilung. Dabei führt ein ständiger Schädigungsreiz zu anhaltenden Versuchen der Gewebsreparatur und die normale Regeneration mit einem adäquaten Heilungsprozess ist gestört, zu viel entstandene Matrix wird nicht abgebaut und es resultiert eine Matrixakkumulation. Die Folge ist die Organfibrosierung. Eine tubulo-interstitielle Fibrose ist dabei neben der vermehrten Einlagerung von Matrixkomponenten im Interstitium u. a. durch Tubulusatrophie und -dilatation charakterisiert (2).

1.2 Kollagen-produzierende Zellen in der Niere

1.2.1 Fibroblasten und Myofibroblasten

Die Produktion von extrazellulären Matrixkomponenten wie Kollagen wird in der Niere bislang vor allem den Fibroblasten und Myofibroblasten zugeschrieben. Dabei können lokal freigesetzte Mediatoren wie TGF- β , PDGF oder FGF-2 eine Aktivierung ortsständiger Fibroblasten sowie deren Proliferation und Entwicklung zu α -SMA-exprimierenden Myofibroblasten anregen (2-4). Eine autokrine Proliferation der renalen Fibroblasten unterscheidet dabei die reguläre Wundheilung von progressiver Fibrose (5). Weiterhin führten in den 1990er Jahren *in vitro*-Beobachtungen zu der Annahme, dass sich tubuläre Epithelzellen in interstitielle Myofibroblasten umwandeln können, um dann unverhältnismäßig viel Matrixmaterial zu produzieren. Diese Reaktion nennt man epithelial-mesenchymale Transformation, EMT (6). Diese Annahme wurde durch darauf folgende *in vitro*- und *in vivo*-Versuche bestätigt. So konnte u. a. im Modell der einseitigen Ureterligatur gezeigt werden, dass FSP1⁺ Fibroblasten aus epithelialen Tubuluszellen entstehen (7). Die epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung wird durch Zytokine, insbesondere TGF- β und BMP-7, und durch Interaktion mit der Basalmembran reguliert (8;9). Kürzlich konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich renale Endothelzellen ebenfalls zu Fibroblasten und Myofibroblasten entwickeln können. Dieser Prozess nennt sich endothelial-mesenchymale Transition, EndMT (10). Sowohl die ortsständigen Fibroblasten in der Niere wie auch die Tubulusepithelzellen mit Ausnahme der Sammelrohrzellen stammen vom metanephrogenen Mesenchym ab, so dass es sich in beiden Fällen um Zelltypen handelt, die als intrinsische Zellen der Niere angesehen werden können (11;12).

1.2.2 Fibrozyten

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass eine weitere Zellpopulation an der Kollagensynthese beteiligt ist. Zellen des peripheren Blutes können sich unter bestimmten Umständen zu kollagen-produzierenden Zellen differenzieren. Diese 1994 erstmals von Bucala et al. beschriebenen Zellen des peripheren Blutes werden Fibrozyten genannt (13). Dabei handelt es sich um Zellen, die in Abhängigkeit der lokal exprimierten Chemokine und Adhäsionsmoleküle aus dem Knochenmark in erkranktes Gewebe einwandern, sich dort zu Fibrozyten differenzieren und in bestimmten Erkrankungsmodellen wesentlich zur Entstehung einer Fibrose beitragen (14;15).

1.2.2.1 Hämatopoietischer Ursprung und mesenchymale Eigenschaften von Fibrozyten

Phänotyp

Diese aus dem Knochenmark stammenden Fibroblasten-ähnlichen Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Marker, die hämatopoietische Stammzellen und Monozyten kennzeichnen, und sind gleichzeitig in der Lage, extrazelluläre Matrixproteine zu produzieren. Dies konnte in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegt werden (16-19). Bereits Bucala et al. zeigten 1994, dass Fibrozyten den hämatopoietischen Stammzellmarker CD34 und den Pan-Leukozyten-Marker CD45 sowie mehrere Antigene, die charakteristisch für Monozyten sind, auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dazu gehören u. a. die Adhäsionsmoleküle CD11b und CD18 (13). Morphologisch haben Fibrozyten ähnlich den Fibroblasten ein spindelförmiges Aussehen und produzieren u. a. die Zytoskelettkomponente Vimentin, die fibroblasten-typischen Kollagene I und III sowie Fibronektin (13). Anfänglich war man der Meinung, dass Fibrozyten ca. 0,1 - 0,5 % der zirkulierenden Population der nicht-erythrozytären Zellen ausmachen. Doch ergänzende Experimente machten deutlich, dass Fibrozyten als solche nicht im peripheren Blut vorhanden sind, sondern von zirkulierenden Vorläuferzellen abstammen (16;17;20). Dabei ist der genaue Ursprung noch ungeklärt. Mittels verschiedener *in vitro*-Depletionsversuche wurde gezeigt, dass humane Fibrozyten aus einer Subpopulation von CD14⁺ peripheren Blut-mononukleären-Zellen (PBMC) hervorgehen (16-18;20;21). Ergänzend wurde die Expression der IgG-Rezeptoren FcγRI (CD64) und FcγRII (CD32), nicht aber des niedrig-affinen IgG-Rezeptors FcγRIII (CD16) für diese Vorläuferzellen nachgewiesen (17;18;22). Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass es sich bei den Vorläuferzellen von humanen Fibrozyten um eine kleine Gruppe CD14⁺ CD16⁻ Monozyten handeln könnte, die den CC Chemokinrezeptor (CCR) 2 auf ihrer Oberfläche tragen und häufig in Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen auftreten. Analog dazu finden sich in der Maus Ly-6C^{high} CCR2⁺ Monozyten, denen ähnliche Eigenschaften zugeschrieben werden (23-25).

Fibrozytendifferenzierung

Die Zugabe von aufgereinigten T- oder B-Zellen zu kultivierten humanen CD14⁺ PBMCs zeigte, dass eine gemeinsame Kultivierung von CD14⁺ Zellen und T-Zellen die vermehrte Bildung von Fibrozyten zur Folge hat (16). Dagegen bilden sich in einer reinen T-Zellkultur oder nach Zugabe von T-Zell-konditioniertem Medium oder B-Zellen zu CD14⁺ PBMCs

keine Fibrozyten aus. Da Fibrozyten keine typischen T-Zell-Marker (CD2, CD3, CD4 oder CD8) auf ihrer Oberfläche aufweisen, wurde festgestellt, dass T-Zellen die Differenzierung von humanen Fibrozyten positiv beeinflussen, nicht aber ihre Vorläuferzellen sind (16). Darüberhinaus fördert ein von nicht-monozytären Zellen konditioniertes Medium die Entwicklung von humanen Fibrozyten stark (20).

Die Entwicklung reifer Fibrozyten aus ihren Vorläuferzellen wird durch eine ganze Reihe von verschiedenen Faktoren beeinflusst und gesteuert. So steigert TGF- β , das u. a. für die Proliferation von Fibroblasten wichtig ist, in Kultur sowohl die Ausbeute an Fibrozyten als auch die Expression von Kollagen I (16;20). Weiterhin induzieren TGF- β und Endothelin- (ET-) 1 die Expression von α -smooth-muscle-Aktin (α -SMA), einem spezifischen Marker für Myofibroblasten, in Fibrozyten (16;19). Die Interleukine (IL-) 4 und 13 begünstigen zudem die Entwicklung reifer humanen Fibrozyten aus ihren Vorläuferzellen. Dabei nehmen diese direkt auf die Monozytenvorläufer Einfluss, steigern so deren Differenzierung in reife Fibrozyten, induzieren aber keine Proliferation bereits entwickelter Fibrozyten (26).

Eine Hemmung der Fibrozytendifferenzierung wurde mit humanem Serum oder Plasma beobachtet. Als verantwortlicher Faktor wurde Serum Amyloid P (SAP) identifiziert (17). SAP bindet dabei an die Fc-Rezeptoren für Immunglobulin G (IgG; Fc γ Rs), die auf den Vorläuferzellen exprimiert werden (17;18). Die Aktivierung der IgG-Rezeptoren stellt wohl ein inhibierendes Signal für die Fibrozytenentwicklung dar. So können auch komplexierte IgGs durch die Aktivierung der Rezeptoren die Differenzierung von Fibrozyten unterdrücken (18). All-trans-Retinsäure und die pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und Interferon- (IFN-) γ zeigen ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die Differenzierung von humanen Monozyten in Kollagen-produzierende Zellen (26;27). IFN- γ wirkt hierbei wohl direkt auf die monozytären Fibrozytenvorläufer und unterdrückt deren Differenzierung in Fibrozyten. Die Anwesenheit von IFN- γ wie auch IL-12 führt in Kulturen mit PBMCs vielmehr zu einer gesteigerten Anzahl von Makrophagen. Die Hemmung der Fibrozytenentwicklung durch IL-12 verläuft wohl indirekt über die Stimulation von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die daraufhin IFN- γ freisetzen und über diesen Weg die Differenzierung der Fibrozyten unterdrücken (26). IL-1 β wirkt sich zwar nicht auf die Reifung von Fibrozyten aus monozytären Vorläuferzellen aus (26), steigert aber die Proliferation bereits ausgereifter Fibrozyten und verringert die Freisetzung von Kollagen (28). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Differenzierung von Fibrozyten von einem komplexen Zusammenspiel aus Zytokinen, Chemokinen und Plasmaproteinen im Bereich von entzündetem Gewebe beeinflusst wird.

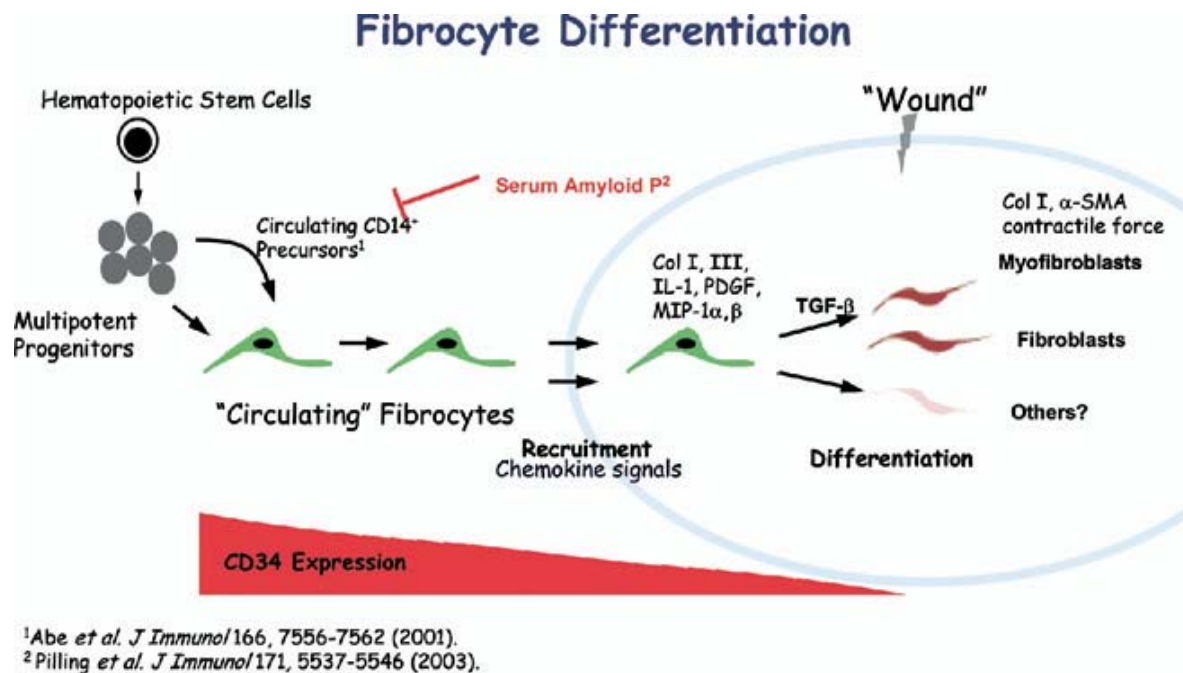


Abb. 1: Modell der Fibrozytendifferenzierung. Entzündungen oder Gewebeschäden führen zur Rekrutierung von Fibrozyten aus dem peripheren Blut. Die zirkulierenden Fibrozyten stammen dabei von $CD14^+$ Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Diese Fibrozyten sind $CD34^+$, verlieren diese Eigenschaft aber, wenn sie sich im Gewebe niederlassen und sich dort weiter differenzieren (29). Col = Kollagen; IL = Interleukin; MIP = *macrophage inflammatory protein*; PDGF = *platelet-derived growth factor*; SMA = *smooth-muscle actin*; TGF = *transforming growth factor*

Fibrozytenwanderung

Die Migration von Fibrozyten in entzündetes oder fibrosierendes Gewebe wird dem Krankheitsprozess und den betroffenen Organe entsprechend von verschiedenen Chemokinen gesteuert. Humane Fibrozyten exprimieren dafür eine Reihe von CC und CXC Chemokinrezeptoren (CCR; CXCR) auf ihrer Oberfläche, wie z.B. CCR3, CCR5, CCR7 und CXCR4 (15;16;30). Fibrozyten wandern als Antwort auf SLC (*secondary lymphoid chemokine*), dem Liganden von CCR7 in die Haut (16), während die Fibrozytenmigration in die Lunge zum Teil durch CXCR4 und seinen Liganden CXCL12 gesteuert wird (15). Für murine Fibrozyten wurde die Expression der Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5, CCR7 und CXCR4 bestätigt (15;16;31;32). CCR2 scheint dabei eine Rolle für die Rekrutierung von Fibrozyten in die Lunge zu spielen, was über die CCR2-Liganden CCL2 und CCL12 vermittelt wird (32;33). CCR7 scheint weiterhin entscheidend für die Wanderung von Fibrozyten als Antwort auf SLC/CCL21 in die Niere zu sein (30).

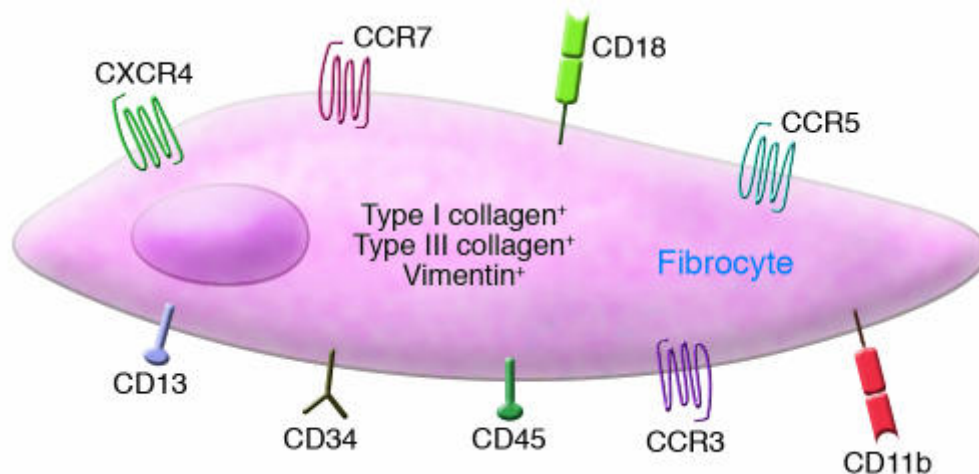


Abb.2: Eigenschaften humaner Fibrozyten. Humane Fibrozyten exprimieren EZM-Komponenten (Kollagen I und III, Vimentin) sowie verschiedene Oberflächenmoleküle (CD45, CD34, CD11b, CD18, CD13) und Chemokinrezeptoren (CCR3, CCR5, CCR7, CXCR4) (34).

Eigenschaften und Funktion

Fibrozyten setzen eine Reihe unterschiedlicher Faktoren frei, die u. a. für die Wundheilung und Gewebereparatur eine Rolle spielen. So begünstigen sie z. B. die Angiogenese, die Ausbildung neuer Blutgefäßstrukturen. Diese findet u. a. während Wundheilungsprozessen statt, pathologisch ist sie Teil von chronischen Entzündungen und fibrosierenden Erkrankungen. Reife Fibrozyten exprimieren nämlich EZM-degradierende Enzyme wie die Matrix Metalloproteinase- (MMP-) 9, die zur Einwanderung von endothelialen Zellen führt, und sezernieren verschiedene pro-angiogene Faktoren wie VEGF, bFGF, IL-8 und PDGF sowie den hämatopoietischen Wachstumsfaktor. Diese begünstigen ebenfalls die Einwanderung und Proliferation von endothelialen Zellen begünstigen und tragen zur Gefäßbildung bei (35). Neben den pro-angiogenen Faktoren sezernieren Fibrozyten noch weitere Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, die bei der Wundheilung von Bedeutung sind. Auf mRNA-Ebene konnte eine Expression von IL-1 β , IL-8, IL-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, MCP-1, TGF β 1 und M-CSF nachgewiesen werden. Eine Zugabe von IL-1 β oder TNF- α zur Fibrozytenkultur verstärkte die Sekretion dieser Mediatoren (28). MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1 gelten als starke chemische Lockstoffe für T-Zellen, so dass diese Fibrozyten-Produkte möglicherweise an der Rekrutierung von CD4 $^{+}$ T-Zellen während Reparaturprozessen im Gewebe beteiligt sind. Fibrozyten, die aus PBMCs von Verbrennungspatienten isoliert wurden, produzieren erhöhte TGF- β und CTGF-Spiegel. Diese beiden Wachstumsfaktoren spielen u. a. eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von dermalen Fibroblasten und bei der

Wundheilung (36). Darüberhinaus scheinen Fibrozyten auch antigenpräsentierende Eigenschaften zu besitzen. Sie exprimieren den MHC-Klasse-II-Komplex (*major histocompatibility complex*) sowie die ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche und scheinen damit in das Abfangen von Antigenen involviert zu sein, um sie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren (37;38).

1.2.2.2 Fibrozyten im Tiermodell

Die Charakterisierung von Fibrozyten wurde größtenteils mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten durchgeführt. Ein Nachweis von Fibrozyten und ihre Beteiligung an der Entstehung einer Organfibrose konnte zudem in zahlreichen tierexperimentellen Studien erbracht werden.

Abstammung der Fibrozyten aus dem Knochenmark

Mit unterschiedlichen knochenmarks-chimären Mäusen konnte der Ursprung von Fibrozyten aus dem Knochenmark bestätigt werden (14;22;39;40). Nach Transplantation von männlichem Knochenmark in weibliche Mäuse wurden in einem Wundheilungsmodell die eingewanderten Fibrozyten untersucht und es wurde festgestellt, dass ca. 94 % der nachgewiesenen Fibrozyten ein Y-Chromosom aufweisen und somit ihren Ursprung aus dem Knochenmark haben (39). Ähnliche Untersuchungen wurden mit Hilfe von GFP-transgenen knochenmarks-chimären Mäusen im Modell der bleomycin-induzierten Lungenfibrose durchgeführt (14). Auf diese Weise konnte eindrucksvoll der Nachweis erbracht werden, dass Fibrozyten hämatopoietischen Ursprungs sind und in entzündetes oder fibrotisches Gewebe einwandern.

Differenzierung von Fibrozyten aus Vorläuferzellen

In einem Wundheilungsmodell sowie im Modell des chronischen, allergischen Asthmas konnte gezeigt werden, dass sich adoptiv transferierte reife Fibrozyten im erkrankten Gewebe anreichern und dort zur Entstehung der Fibrose beitragen (16;19). Allerdings entspricht die Einwanderung von ausgereiften Fibrozyten wohl nicht dem natürlichen Mechanismus, dem die Fibrozytenentwicklung und –migration unterliegt. Die *in vivo*-Differenzierung der Fibrozyten aus ihren zirkulierenden Vorläuferzellen scheint nämlich

hauptsächlich im Gewebe und nicht im peripheren Blut stattzufinden (21;22;41). Im Modell der fibrotischen Kardiomyopathie kam es infolge einer erhöhten Sekretion von CCR2-Liganden zu einem verstärkten Einwandern von Monozyten aus dem peripheren Blut und einer daraus resultierenden Anreicherung von CD45⁺ CD34⁺ Fibrozyten. Eine Behandlung mit SAP, das als Differenzierungsinhibitor gilt, reduzierte den Gehalt an Fibrozyten und Myofibroblasten im Gewebe, ohne jedoch die Stärke der Entzündungsreaktion oder die Chemokinproduktion zu beeinflussen. Hohe SAP-Spiegel unterdrücken hierbei womöglich die Entwicklung der Fibrozyten aus ihren monozytären Vorläuferzellen (22). Im Modell der Intimahyperplasie bei Schafen infiltrierte eine Subpopulation CFSE-markierter Leukozyten in die Intima und entwickelte dabei den Phänotyp von Fibrozyten (CD45⁺ CD34⁺ Vimentin⁺). Diese CFSE⁺ spindelförmigen Fibrozyten bildeten zudem auch α -SMA (21). Daraus ist zu schließen, dass sich die Fibrozyten aus zirkulierenden Leukozyten entwickelt haben, ins fibrosierende Gewebe eingewandert sind und dort eine weitere Differenzierung folgte.

Die Entwicklung von Fibrozyten in reife mesenchymale Zellen ist u. a. mit phänotypischen Veränderungen wie dem Verlust der CD34-Expression verbunden (19;39). Eine Isolation von CD45⁺ CD13⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Wundheilungsmodells zeigte eine steigende α -SMA-Expression im Verlauf des Heilungsprozesses. Die Differenzierung von Fibrozyten in myofibroblasten-ähnliche Zellen ging dabei mit einer gesteigerten TGF- β -Produktion im Wundgewebe und einer progressiven Herabregulation der CD34- und CD45-Expression einher (39). Eine weitere Studie mit GFP-transgenen knochenmarks-chimären Mäusen konnte den hämatopoietischen Ursprung von CD45⁺ Kollagen I⁺ α -SMA⁺ Zellen bestätigen (42). Fibrozyten können sich also in reife Myofibroblasten im Rahmen normaler Wundheilung wie auch infolge von wiederholten Entzündungsreaktionen, die zu fibrotischen Defektheilungen führen, weiterentwickeln (19;39;42). Während dieses Differenzierungsprozesses verlieren die Myofibroblasten fibrozytären Ursprungs allerdings ihre charakteristischen Oberflächenmarker, die sie von sich aus Fibroblasten entwickelten Myofibroblasten oder ortsständigen Mesenchymzellen abgrenzen würden.

Migration

Fibrozyten fanden sich in den Kulturen von explantiertem Lungengewebe oder Bronchoalveolarlavagen von Mäusen mit Lungenentzündung oder FITC-induzierter Lungenfibrose. Ob die Differenzierung der Fibrozyten dabei bereits im Gewebe oder erst

in der Kultur stattfand, ist nicht zu beantworten. Auffällig dagegen waren die Kulturen von CCR2-defizienten Mäusen. Diese enthielten eine geringere Zahl an Fibrozyten. Zudem wiesen sie geringere fibrotische Veränderungen als Antwort auf die FITC-Exposition auf. Eine Transplantation von CCR2^{+/+} Knochenmarkszellen auf CCR2^{-/-} Mäuse führte wieder zu einer gesteigerten Zahl von Fibrozyten in der Lungenkultur dieser Mäuse. Die Fibrozyten dieser Kulturen exprimierten ebenfalls CCR2, allerdings konnte dieser Rezeptor nach sieben Tagen Kultur nicht mehr nachgewiesen werden (32). Diese Daten bestätigen eine entscheidende Rolle von CCR2 für die Rekrutierung von Fibrozyten während fibrosierender Prozesse infolge von toxisch-induzierten Entzündungsreaktionen in die Lunge. Weiterhin sind der Chemokinligand CXCL12, der Ligand von CXCR4, und CCL21, der an CCR7 bindet, an der Einwanderung von Fibrozyten in fibrosierendes Gewebe beteiligt, was in Modellen der Lungenentzündung (15) und der renalen Fibrose (30) gezeigt werden konnte. Diese in Erkrankungsmodellen der Maus erworbenen Kenntnisse über die Rekrutierung von Fibrozytenvorläufern mittels CCR2, CCR7 und CXCR4 könnten auch für die Einwanderung humaner Fibrozytenvorläufer in entzündetes und fibrosierendes Gewebe von Bedeutung sein. Schließlich konnte sowohl für humane Fibrozyten (16;17) als auch für eine Subpopulation von CD14⁺ CD16⁻ humaner Monozyten (23-25) die Expression von CCR2, CCR7 und CXCR4 nachgewiesen werden.

Zusammenhang von Fibrozytenanreicherung und Gewebsfibrose

Eine Reihe verschiedener Modelle von Lungen- (15;19;43), Nieren- (30;44), oder Gefäßerkrankungen (21;41) sowie das Modell der ischämischen Kardiomyopathie (22) oder der Kolitis (45) bestätigen einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Fibrozyten im entzündeten Gewebe und der Entwicklung einer Fibrose und damit verbundener Gefäßneubildung. Hierbei scheinen die Fibrozyten eine neue Population kollagen I-produzierender und/oder α -SMA⁺ Zellen darzustellen, die während der reaktiven und reparativen fibrotischen Prozesse im entzündeten Gewebe auftreten. Eine reduzierte Anreicherung von Fibrozyten im Gewebe infolge verschiedener Mechanismen wie z. B. der Verabreichung von SAP, einem Inhibitor der Fibrozytendifferenzierung (22), oder der Einsatz neutralisierender Antikörper gegen fibrozyten-rekrutierende Chemokinliganden (15) resultiert dabei in einer geringeren Kollagen I-Ablagerung und einer verminderten Myofibroblasten-Anreicherung (15;21;22;41). Dies stützt zum Einen die Hypothese, dass sich Fibrozyten zu reifen Myofibroblasten weiterdifferenzieren können. Zum Anderen zeigt die Expression einer Reihe von verschiedenen Zytokinen und

Wachstumsfaktoren, die u. a. die Angiogenese (46) oder Fibroblastenhyperplasie (36) induzieren und die Freisetzung von EZM-Komponenten ortsständiger Fibroblasten, die pro-fibrotischen Eigenschaft von Fibrozyten und ihre Beteiligung am fibrotischen Gewebsumbau, fördern (36).

1.2.2.3 Fibrozyten und ihre Beteiligung an humanen Erkrankungen

Die Biologie der Fibrozyten und ihrer Vorläuferzellen ist sehr komplex und noch nicht vollkommen aufgeklärt. Trotz zahlreicher *in vitro*- und *in vivo*-Studien ist nicht vollständig klar, ob Fibrozyten eine nachteilige oder vorteilhafte Rolle im Krankheitsverlauf spielen. Einerseits scheinen sie durch die Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und EZM-Komponenten sowie die Unterstützung der Angiogenese (47) entscheidend für die Wundheilung zu sein (39;48). Mesenchymale Stammzellen im Modell der bleomycin-induzierten Lungenfibrose können durch eine Hemmung inflammatorischer Zytokine vor Lungenentzündungen schützen (49). Andererseits sprechen einige Indizien dafür, dass Fibrozyten an anormaler Wundheilung und Narbenbildung und verschiedenen weiteren humanen Erkrankungen beteiligt sind. Dies soll im Folgenden näher dargestellt werden.

Fibrozyten und ihre Rolle bei hypertropher Narbenbildung und Keloiden

Hypertrophe Narbenbildung und Keloide repräsentieren zwei unterschiedliche Formen der anormalen Wundheilung und entwickeln sich häufig infolge umfassender Verbrennungen. Charakteristisch sind Bindegewebswucherungen infolge übermäßiger EZM-Ablagerungen in der Dermis, die sich zu Wülsten formen und sich über das Hautniveau erheben können. Das Keloid verlässt hierbei im Gegensatz zur hypertrophen Narbe die ursprünglichen Wundgrenzen und infiltriert auch gesundes Gewebe. Diese Wulstnarben zeigen eine erhöhte TGF- β -Expression, eine große Zahl an kollagen I und III-produzierenden Zellen und zahlreiche α -SMA⁺ Myofibroblasten. Aiba und Tagami (50) konnten spindelförmige Zellen in der Haut detektieren, die CD34 und Prolin-4-Hydroxylase, das u. a. an der Kollagen-Synthese beteiligt ist, exprimieren. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Narben- bzw. Keloidbildung wurde dabei beobachtet, dass die CD34-Expression zurückging und im Gegensatz dazu die Prolin-4-Hydroxylase-Expression anstieg. Die spindelförmigen Zellen in den hypertrophen Narben exprimieren zudem LSP-1 und Pro-Kollagen I (51). In geringerer Dichte sind diese Zellen auch in ausgereiften Narben nachweisbar. Die LSP-1-Expression ist charakteristisch für Fibrozyten und stellt einen stabileren Marker als

beispielsweise CD34 dar. Fibrozyten sind also in verschiedenen Formen von humanen Narben, vor allem aber in hypertrophen Narben nach Verbrennungsverletzungen, nachweisbar und sind hier wohl an der Matrixbildung beteiligt. Wie schon in diversen Tiermodellen zu beobachten war, bestätigt sich die Herunterregulation des Antigens CD34 im Laufe der Zeit und eine damit verbundene höhere Kollagen I-Synthese (19;39).

Fibrozyten und ihre Rolle bei asthmatischen Erkrankungen

Asthma bronchiale ist eine weitverbreitete und heterogene entzündliche Erkrankung der Atemwege, die gewöhnlich einen chronisch-rezidivierenden Verlauf nimmt. Es ist gekennzeichnet durch ein anfallsweises Auftreten von Kurzatmigkeit und Atemnot infolge von Bronchialverengung durch Entzündungen oder Hyperreaktivität der Atemwege. Diese Atemwegsverengung wird durch vermehrte Schleimsekretion, Bronchospasmen und Schleimhautödeme verursacht. In den meisten Formen des Asthmas kommt es zu einer verstärkten Ansammlung entzündlicher Infiltrate aus aktivierten T-Zellen, CD14⁺ Monozyten, Eosinophilen und Mastzellen im Bronchialgewebe. Zudem finden Umbauprozesse im Gewebe statt, die von Angiogenese sowie einer Ansammlung von Fibroblasten und Myofibroblasten, einer Verdickung der Lamina reticularis infolge der übermäßigen EZM-Ablagerung und einer Hyperplasie bronchialer glatter Muskelzellen begleitet werden. Letztendlich haben diese Umbauprozesse eine Verdickung der Bronchialwand zur Folge und verursachen so eine irreversible Verminderung der Lungenfunktion wie sie bei Langzeitpatienten beobachtet wird. In der allergischen Form des Asthmas bronchiale führt Allergenexposition zu einer gesteigerten Produktion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren, u. a. werden dabei der CCR2-Ligand MCP-1 (CCL2), ET-1 und TGF- β ausgeschüttet. Dies resultiert in einer verstärkten Migration von CD14⁺ Monozyten, T_H2 Helfer-T-Zellen und Eosinophilen in die Bronchialmucosa. Das Infiltrat hält sich hartnäckig über mehrere Tage und ist mit dem Aufkommen neuer Myofibroblasten innerhalb von 24 Stunden nach der Allergenaussetzung verbunden. In diesem Zeitraum konnten auch CD34⁺ und Pro-Kollagen I-produzierende Fibrozyten in den Atemwegen von Patienten mit allergischem Asthma nachgewiesen werden. Ein Großteil davon exprimierte α -SMA und war vor allem in Bereichen von EZM-Neubildung lokalisiert (19). Die gleichzeitige Anwesenheit von aktivierten T-Lymphozyten sowie die hohen TGF- β -Spiegel im Gewebe nach Allergenexposition fördern dabei die Entwicklung von Fibrozyten aus CD14⁺ monozytären Vorläufern, die aufgrund der gesteigerten MCP-1-Sekretion eingewandert sind, und begünstigen wohl eine weitere Differenzierung zu

Myofibroblasten (19). In den Bronchialbiopsien von Patienten mit allergischem Asthma konnten $CD34^+$ $CD45^+$ α -SMA⁺ Fibrozyten in Clustern nahe der epithelialen Basalmembran gezeigt werden, wobei deren Dichte mit der Verdickung der Lamina reticularis korrelierte (52). Zudem differenzierten sich in Kulturen bronchialer mononukleärer Zellen dieser Asthmapatienten Fibrozyten aus, die sich vermutlich aus Vorläuferzellen im Infiltrat entwickelten. Dabei untermauert die Korrelation der Anzahl der α -SMA⁺ Fibrozyten und der Stärke der Lamina reticularis die Hypothese, dass sich Myofibroblasten aus Fibrozyten an Orten neuer EZM-Ablagerungen bilden können. Myofibroblasten und andere mesenchymalen Zellen der Bronchialschleimhaut von Asthmapatienten, die den Chemokinrezeptor CCR7 exprimieren, stammen möglicherweise von Fibrozyten und deren zirkulierenden Vorläuferzellen ab. Zugleich sprechen erhöhte CCL19-Spiegel sowie eine erhöhte Expression des Rezeptors CCR7 für eine mögliche Rekrutierung von Fibrozyten über diesen Weg (53). $CD34^+$ $CD45^+$ Kollagen I⁺ Fibrozyten sind zudem im Blut von Patienten mit chronisch-obstruktivem Asthma in höherer Zahl nachweisbar als im Blut von Asthma-Patienten mit normaler Lungenfunktion (54) und finden sich in ASM (*airway smooth muscle*)-Bündeln von Asthma-Patienten aller Schweregrade, im peripheren Blut und in der Lamina propria. Dabei steuern ASM-Zellen wohl die Migration von Fibrozyten über die Freisetzung von PDGF. In diesem Fall ist allerdings noch nicht geklärt, welche Rolle Fibrozyten möglicherweise bei der Entwicklung einer ASM-Hyperplasie spielen (55).

Fibrozyten und ihre Rolle bei interstitieller pulmonaler Fibrose

Idiopathische interstitielle Pneumonien bilden eine heterogene Gruppe seltener chronischer Lungenerkrankungen unbekannter Ätiologie, die von verschiedenen Graden der Entzündung und der interstitiellen pulmonalen Fibrose gekennzeichnet sind. Die idiopathische Lungenfibrose (IPF, *idiopathic pulmonary fibrosis*) oder auch interstitielle Pneumonie ist die am weitesten verbreitete Form. Die Behandlungsmöglichkeiten sind häufig stark eingeschränkt und daher endet der Krankheitsverlauf meist tödlich. Der chronische fibro-proliferative Verlauf ist charakterisiert durch die Bildung von Fibroblasten- und Myofibroblasten-Anhäufungen, die sich von umgebenden Zellen abgrenzen (*fibroblastic foci*). Myofibroblasten, die sich dauerhaft im fibrosierenden Gewebe einnisten, gelten als Hauptquelle interstitiellen Kollagens und führen damit zu einem progressiven Gewebsumbau mit dem allmählichen Verlust der Lungenfunktion. Biopsiegewebe von IPF-Patienten enthält Zellen, die CCR7 und CD45 ko-exprimieren (56). Diese Zellen

exprimierten allerdings kein CD34 oder α -SMA. Weiterhin scheint, wie bereits im Modell der bleomycin-induzierten Lungenfibrose gezeigt (15), die CXCR4-CXCL12-Achse eine wichtige Rolle für die Wanderung von Fibrozyten im Rahmen einer Lungenfibrose zu spielen. So ist die CXCR4-Expression sowie die seines Liganden CXCL12 im Lungengewebe von IPF-Patienten erhöht (56;57). Zugleich zeigte sich eine erhöhte Zahl an CXCR4⁺ CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten im Blut der IPF-Patienten (57). Diese CXCR4⁺ Kollagen I⁺ Zellen konnten auch im Lungengewebe von IPF-Patienten nachgewiesen werden, während sie im Gewebe gesunder Probanden nicht detektierbar waren. Die Fibrozyten waren hierbei häufig in der Nähe der *fibroblastic foci* lokalisiert (58). Darüberhinaus war der SDF1/CXCL12-Spiegel im Plasma und teilweise auch in der Bronchoalveolarlavage dieser IPF-Patienten erhöht. Der Chemokin-Spiegel korreliert hier direkt mit der Schwere der Krankheit (58). Aufgrund neuerer Daten wurden Fibrozyten nun als klinischer Marker für den Krankheitsverlauf der IPF vorgeschlagen (59;60). Fibrozyten wurden als CD45⁺ Kollagen I⁺ Zellen in erhöhter Zahl im Blut stabiler IPF-Patienten gezeigt. Während Phasen akuter Verschlimmerung steigt die Zahl der zirkulierenden Fibrozyten nochmals deutlich an, fällt aber nach der Genesung auf das Ausgangsniveau zurück. Im Vergleich dazu zeigen Patienten mit ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) keine erhöhte Zahl an zirkulierenden Fibrozyten. Damit scheint die Präsenz von Fibrozyten ein Anzeichen für fibrotische Gewebsentzündungen zu sein und nicht aber für eine akute Lungenerkrankung per se. Die Zahl der Fibrozyten steht dabei zwar in keinem direkten Zusammenhang mit weiteren klinischen Parametern, ist aber prädiktiv für eine frühere Mortalität bei IPF (59).

Fibrozyten und ihre Rolle bei der nephrogenen systemischen Fibrose

Die nephrogene systemische Fibrose (NSF), früher auch als nephrogene fibrosierende Dermopathie bezeichnet, ist eine Erkrankung, die bei Patienten mit stark eingeschränkter Nierenfunktion und bei Dialysepatienten auftritt. Der klinische Verlauf dieser fibrotischen Erkrankung ist durch eine symmetrische und progressive Verhärtung der Haut, die vor allem die Extremitäten betrifft sowie eine krankhafte Vermehrung von Bindegewebe von Leber, Herz, Lungen, Skelettmuskeln und Zwerchfell gekennzeichnet. Die Pathogenese ist noch nicht vollständig geklärt, doch scheint der Einsatz von gadolinium-haltigen MR-Kontrastmitteln eine erhebliche Rolle zu spielen (61). Dabei wird davon ausgegangen, dass die Freisetzung von hochtoxischen freien Gadolinium-Ionen die Entstehung von NSF verursacht. Bei Patienten mit stark eingeschränkter Nierenfunktion ist die Halbwertszeit

von Gd-haltigen Kontrastmitteln erheblich verlängert. Eine spontane Dissoziation der Kontrastmittel führt zu einer Freisetzung von freien Gd^{3+} -Kationen. Diese freien Gd^{3+} -Kationen werden von endogenen Anionen, besonders Phosphaten angezogen und bilden unlösliche Salze, die sich im Gewebe festsetzen. Diese unlöslichen Moleküle werden wiederum von Makrophagen umlagert, die daraufhin eine Vielzahl von Zytokinen, u. a. TGF- β freisetzen, die ihrerseits Fibrozyten anlocken sollen (62;63). In den geschädigten Hautpartien und beteiligten Organen von NSF-Patienten zeigen sich ein fibro-proliferativer Prozess und eine starke Infiltration von $CD68^+$ Monozyten und spindelförmigen Zellen, die sich im Geflecht aus elastischen Fasern und Kollagen einnisten. $CD34^+$ und/oder $CD45^+$ spindelförmige Zellen, die Kollagen I produzieren, konnten dabei in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (64-66). Diese Zellen erscheinen bereits in frühen Stadien der fibrotischen Prozesse und sind an Stellen aktiver Fibrogenese zu finden (64;66). In geschädigten Hautgeweben und Muskelpartien kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von TGF- β (67), so dass die Vermutung nahe liegt, dass dieser Wachstumsfaktor eine Rolle für die Entwicklung von Fibrozyten aus ihren monozytären Vorläufern spielen könnte.

1.2.3 Fibrozyten in der Niere

Fibrozyten werden im Rahmen der nephrogenen systemischen Fibrose (NSF) häufig nachgewiesen und gelten als Mitverantwortliche für die Kollagenbildung im fibrotischen Gewebe dieser Krankheit. Obwohl die tubulo-interstitielle Fibrose die Endstrecke vieler Nierenerkrankungen darstellt, ist der Ursprung der EZM-produzierenden Zellen im Interstitium noch nicht aufgeklärt und die Rolle von Fibrozyten dabei weitgehend unklar. Während einer progressiven Nierenfibrose bei Mäusen, ausgelöst durch eine einseitige Ureterligatur, infiltrieren $CD45^+$, Kollagen I $^+$ Fibrozyten das Interstitium, dabei vor allem die kortikomedullären Bereiche (30). In diesem Modell steigt die Zahl der Fibrozyten mit dem Verlauf der Fibrose und erreicht wohl einen Höhepunkt nach sieben Tagen. Die Fibrozyten zeigen dabei auch eine Positivität für CD34 (30). Ähnliche Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie mit AT2R-defizienten Mäusen erzielt werden (44). Die Zahl der Fibrozyten war in den AT2R $^{-/-}$ Mäusen höher als in den Wildtypen, was mit einer Verschlechterung der Nierenfibrose in den knock-out Tieren einherging. Im Gegensatz dazu verringerte sich durch eine Hemmung des AT1R-Signalwegs die Zahl der Fibrozyten und das Ausmaß der Fibrose, so dass daraus geschlossen werden kann, dass Angiotensin II und die beiden Angiotensin II-Rezeptoren an der Regulation der

Fibrozytenaktivierung oder Rekrutierung in die Niere beteiligt sind (44). In beiden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Fibrozyten in der Niere die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 exprimieren (30;44). Wobei der CCL21-Spiegel, ein Ligand für CCR7, mit dem Verlauf der Fibrose anstieg (44). Die Blockade des CCL21/CCR7-Signalweges durch neutralisierende CCL21-Antikörper führte zu einer um die Hälfte reduzierten Anzahl an Fibrozyten und verminderten interstitiellen Fibrose mit geringerem Hydroxyprolinegehalt (30).

Im Modell der einseitigen Ureterligatur wurde weiterhin mit transgenen Mäusen, die ein Reportergen unter der Kontrolle des Kollagen I-Promotors exprimieren, die Rolle von Fibrozyten und deren Beteiligung an der EZM-Bildung in der renalen Fibrose untersucht. In einer Studie handelte es sich um transgene Mäuse, die die Reportergene Luciferase und β -Galaktosidase unter dem pro-Col1A2-Promotor exprimieren. In geschlechtsgemischten knochenmarks-chimären Mäusen wurden nach der einseitigen Ureterligatur die Nieren auf die Expression der Reportergene hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass intrinsische Nierenzellen für die Matrixbildung während der Nierenfibrose verantwortlich sind (68). In einer ähnlichen Studie konnten zwei „Quellen“ kollagen-produzierender Zellen nachgewiesen werden. Allerdings wurde den aus dem Knochenmark stammenden Zellen dabei nur eine kleinere Rolle bei der EZM-Produktion zugesprochen. Der Hauptteil wird von intrinsischen Nierenzellen, nämlich den aus Perizyten abstammenden Myofibroblasten übernommen (69). Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass die Expression der Reportermoleküle z.B. aufgrund von fehlender oder unzureichender Stimulation nicht immer vollständig sein muss. Die Promotorgenexpression, in diesem Falle die Kollagen I-Produktion, steht damit nicht immer in vollständigem Zusammenhang mit der Expression der Reportergene. Während in den transgenen Mäusen die Expression des Reportergens möglicherweise nur in einem gewissen Teil der kollagen-produzierenden Zellen stattfindet und damit die mögliche Zahl und Vielfaltigkeit der kollagen-produzierenden Zellen unterschätzt wird, können immunfluoreszente Methoden wie Durchflusszytometrie und Immunhistologie die Präsenz von Fibrozyten aufgrund von Hintergrundfärbungen oder begrenzter räumlicher Auflösung überschätzen. Zusammenfassend bleiben die Produktion der EZM-Komponenten in der Niere und die Beteiligung der Fibrozyten daran weiterhin noch nicht vollständig geklärt.

1.3 Die Rolle von CD4⁺ T-Zellen an der Fibrose

Chronische Entzündungsreaktionen sind typischerweise durch eine starke Infiltration von mononukleären Zellen, dazu zählen Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophile und Plasmazellen, gekennzeichnet. Lymphozyten werden dabei in das entzündete Gewebe gelockt, durch Antigenkontakt aktiviert und zur Lymphokinausschüttung angeregt. Diese wiederum aktivieren ihrerseits Makrophagen und andere ortsständige Entzündungszellen. Folglich findet bei einer Reihe chronischer Entzündungskrankheiten eine deutliche Aktivierung der adaptiven Immunantwort statt. Obwohl der Fibrose meist eine Entzündung vorausgeht, ist sie nicht automatisch die Folge einer Entzündung. Die Mechanismen, denen die Fibrose unterliegt, stehen somit nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit denen einer Entzündungsreaktion. CD4⁺ T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle während des Verlaufes einer fibrotischen Erkrankung. In einer Reihe von Studien mit verschiedenen zytokin-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass Leberfibrose eng mit der Entwicklung einer CD4⁺ T_H2 T-Zellantwort und der daraus resultierenden Freisetzung von IL-4, IL-5, IL-13 und IL-21 verknüpft ist (70-75). Dabei zeigen die einzelnen Zytokine eine klare Rollenverteilung, was den Gewebsumbau und die Fibrose betrifft. So konnten IL-4 Rezeptoren auf vielen murinen oder humanen Fibroblasten gezeigt werden (76;77). IL-13 teilt einige funktionale Eigenschaften mit IL-4, da sie beide denselben Signalweg nutzen. U. a. werden beiden Zytokinen pro-fibrotische Eigenschaften nachgesagt. Auch konnte eine aktivierende Rolle der beiden auf die Differenzierung von humanen Fibrozyten aus ihren monozytären Vorläuferzellen nachgewiesen werden (26). Im Gegensatz dazu zeigen T_H1-assoziierte Zytokine wie INF- γ oder IL-12 anti-fibrotische Eigenschaften und hemmen die Entwicklung von Fibrozyten aus ihren zirkulierenden Vorläufern (26).

1.3.1 Signaltransduktion von CD4⁺ T-Zellen

Die Signaltransduktion von CD4⁺ T-Zellen, die für die Produktion von Zytokinen notwendig ist, läuft über die Aktivierung der Phospholipase C. Diese katalysiert die Hydrolyse des Plasmamembran-Phospholipids PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat) in Inositol-3-Phosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerin (DAG). IP₃ und DAG aktivieren dann zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege in T-Zellen. IP₃ führt dabei durch Bindung an Kalziumkanäle zu einer schnellen Freisetzung von Ca²⁺ ins Cytosol, was eine Öffnung weiterer Kalziumkanäle in der Plasmamembran und einen Influx von extrazellulärem Ca²⁺ zur Folge hat. Die Ca²⁺-Ionen binden nun an Calmodulin. Dieser Komplex aktiviert u. a.

die Serin/Threoninkinase Calcineurin. Dadurch wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die in der Transkription verschiedener Zytokine endet. An dieser Stelle setzt eine Reihe von Immunsuppressiva in die Regulation der Zytokinproduktion von T-Zellen ein.

1.3.2 Calcineurin-Inhibitoren und ihre Wirkung auf CD4⁺ T-Zellen

Cyclosporin A ist ein weit verbreitetes Immunsuppressivum, das zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen in der Behandlung von transplantierten Patienten eingesetzt wird. Seine Einführung in die klinische Praxis Ende der 1970er Jahre hat die Überlebensrate der Patienten und ihrer Nieren-, Herz- oder Knochenmarkstransplantate erheblich verbessert. Auch in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen konnten durch Cyclosporin A maßgebliche Erfolge erzielt werden. Allerdings wurden diese therapeutischen Erfolge der immunsuppressiven Behandlung mit Cyclosporin A häufig von dem Auftreten von toxischen Effekten auf die Nieren begleitet. Diese nach Langzeitgabe von Cyclosporin A auftretende chronische Nephropathie, die sowohl die transplantierte wie auch zuvor gesunde Eigennieren betrifft, endet häufig in einer irreversiblen Schädigung der Nieren. Sie ist charakterisiert durch Tubulusatrophie und -dilatation, Hyalinose der afferenten Arteriolen sowie einer vermehrten Ablagerung von extrazellulärer Matrix, die sich in einer tubulo-interstitiellen Fibrose widerspiegelt. Dabei sind die Mechanismen, die zur renalen Fibrose infolge der chronischen Cyclosporin-Nephropathie führen, noch weitgehend unklar. Dies stellt durchaus starke Einschränkungen für die klinische Anwendung von Cyclosporin A und die Transplantationstherapie dar (78-81).

Cyclosporin A ist ein aus den norwegischen Schlauchpilzen *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum* isoliertes zyklisches Peptid, das als Calcineurin-Inhibitor fungiert. Es bindet mit hoher Spezifität an Cyclophilin, ein ubiquitär exprimiertes Protein. Dieser Komplex bindet an Calcineurin und hemmt somit die Enzymaktivität der Ca²⁺/Calmodulin-aktivierten Proteinphosphatase (82). In aktivierten T-Zellen ist Calcineurin für die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT verantwortlich. Daraufhin kann NF-AT in den Zellkern transloziert werden und dort die Transkription von zahlreichen Zytokinen und Zelloberflächenrezeptoren, u. a. von IL-2 aktivieren. Durch die Blockade der Aktivierung von NF-AT und einer daraus resultierenden Hemmung der Transkription von IL-2 bewirkt Cyclosporin A eine Hemmung der Aktivierung und Vermehrung von T-Lymphozyten und wirkt auf diese Weise als Immunsuppressivum.

Ein weiterer Pilzmetabolit im klinischen Gebrauch ist FK506. Es gehört ebenfalls zur Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. FK506 und sein Bindeprotein FKBP teilen mit dem Cyclosporin-Cyclophilin-Komplex die Eigenschaft, an Calcineurin zu binden und somit dessen Aktivität zu unterbinden. Somit kommt es auch hier zur Transkriptionsblockade von IL-2 und damit einer gehemmten T-Zellaktivierung.

Ein weiteres in der Transplantationsmedizin eingesetztes Immunsuppressivum mit einer anderen Wirkweise ist das Antibiotikum Rapamycin, dessen Haupteffekt die Hemmung der T-Zellproliferation ist. Ähnlich FK506 bindet Rapamycin an FKBP, dieser Komplex inhibiert allerdings nicht Calcineurin, sondern bindet an mTOR (*mammalian target of rapamycin*), eine Phosphoinositid-3-Kinase. Somit bleibt die nachfolgende Aktivierung und anschließende Proteinsynthese der S6 Kinase aus. Eine Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 findet also nicht statt. Die Hemmung von mTOR verhindert die Aktivierung der p34cdc2 Kinase und somit die Komplexbildung mit Cyclin E, so dass das Voranschreiten der T-Zellen im Zellzyklus unterbunden wird.

1.4 Zielsetzung

Eine Vielzahl von progredient verlaufenden Nierenerkrankungen hat ein terminales Nierenversagen, das durch fortschreitenden Funktionsverlust bis zum vollständigen Organversagen gekennzeichnet ist, zur Folge. Vor allem bei chronischen Schädigungen führen überschießende Reparaturmechanismen zu einer Defektheilung mit zusätzlicher Schädigung des Organs. Der Funktionsuntergang korreliert eng mit vermehrter Expression von extrazellulären Matrixproteinen im Nierengewebe und ein fibrotischer Gewebsumbau führt zu einem meist irreversiblen Funktionsverlust. Aufgrund neuerer Daten muss man davon ausgehen, dass auch kollagen-produzierende Zellen des peripheren Blutes, sogenannte Fibrozyten, an der Matrixbildung und Fibroseentstehung beteiligt sind. Diese Fibrozyten sind Zellen, die sich aus hämatopoietischen Vorläuferzellen differenzieren. Sie exprimieren Antigene hämatopoietischer Stammzellen auf ihrer Oberfläche und können ähnlich den Fibroblasten extrazelluläre Matrixkomponenten wie Kollagen Typ I produzieren und sich in Myofibroblasten entwickeln. Die genaue zelluläre Herkunft der Vorläuferzellen ist jedoch noch nicht geklärt. Hierfür sollten in dieser Arbeit in einem *in vitro*-Modell mit murinen Splenozyten die Abstammung der Fibrozyten in der Maus mit Hilfe von Zelldepletion und Zellisolation ermittelt werden. Neben der Frage, aus welchen Vorläuferzellen sich die reifen Fibrozyten entwickeln, waren auch Faktoren und Bedingungen, die die Differenzierung von

Fibrozytenvorläufern zu reifen Fibrozyten steigern oder hemmen, Gegenstand der Untersuchungen. Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob und welche „Helferzellen“ für die Entwicklung der Fibrozyten eine Rolle spielen. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob Faktoren, die die Differenzierung von Fibrozyten *in vitro* beeinflussen, auch *in vivo* für die Entwicklung von Fibrozyten von Bedeutung sind. Hierfür wurde im Modell der einseitigen Ureterligatur an Mäusen die Zahl der Fibrozyten in der fibrotischen Niere untersucht. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf der Hemmung bzw. Steigerung der Fibrozytendifferenzierung sowie dem Ausmaß der Fibrose infolge von Zytokinapplikationen in den fibrotischen Nieren von ureterligierten Mäusen. In diesem Kontext war es ebenfalls ein Ziel dieser Arbeit, durch Einflussnahme auf die Helferzellen, die Entwicklung der Fibrozyten und ihre Beteiligung an der renalen Fibrose zu ermitteln.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM 7900 HT detection system	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysenwaage	Satorius, Göttingen
Autoklav	Technomara, Fernwald
Brutschränke Hera Cell	Heraeus, Hanau
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACS Aria	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Electrophoresis Power Supply EPS 310	Amersham Pharmacia Biotech, München
Elektrophoresekammern für Western Blot	BioRad, München
EMax® precision microplate reader	MWG Biotech, Ebersberg
Entwicklerapparatur	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Wetzlar
Fotokamera D70s	Nikon, Düsseldorf
Gelgießstand Mini Protean 3 System	BioRad, München
Kreisschüttler AS250 3	IKA Labortechnik, Staufen
Kryostat CM3050S	Leica, Wetzlar
LightCycler System 2.0	Roche, Mannheim
Magnet OctoMACS Separator	Miltenyi Biotech, Berg. Gladbach
Magnet QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotech, Berg. Gladbach
NanoDrop®	Peqlab, Erlangen

Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipetten (Gilson P10, P20, P100, P1000)	Gilson, Bad Camberg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	ISB Integra Biosciences, Chur, Schweiz
pH-Meter CG840	Schott Instruments, Mainz
Sterilbank	Heraeus, Nürnberg
Stereomikroskop	Leitz, Wetzlar
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex RK255s	Bandelin, Schalltec, Mörfelden-Walldorf
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Heraeus, Nürnberg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

Material	Hersteller
Einmalspitzen (100, 1000 µl)	Sarstedt, Nürnbrecht
Einmalspritzen (2 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Filterspitzen (1000 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Gel-Blotting-Papier (Whatman)	Schleicher & Schuell, Dassel
Glasware	Schott, Mainz
Handschuhe Peha soft	Hartmann, Heidenheim
Hyperfilm	Amersham, Braunschweig
Kanülen BD Microlance 3 (27Gx3/4“, 26Gx1/2“)	BD Biosciences, Heidelberg
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Maxisorp S96	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Nahtmaterial (verschiedenes)	Ethicon / Johnson&Johnson, Norderstedt
Nitrozellulosemembran Optitran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonsiebe (Cell Strainer 40, 70 µm)	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Polystyrolröhrchen für Durchflusszytometer	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
PreSeparationfilter	Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach
Reaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Separationssäulen (MS, LS Columns)	Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Skalpell (No. 10)	Pfm, Köln
Sterilfilter	Corning, New York, USA
SuperFrost® Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Tuberkulinspritzen (Plastipack, 1 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturplatten (96-well)	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
ABTS Peroxidase Substrat	Roche, Mannheim
Acrylamid-Lösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma Aldrich, Taufkirchen

CytoFix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
dNTP-Mix	NatuTec, Frankfurt am Main
ECL-Reagenz	Amersham, Freiburg
Elektrophoresepuffer	BioRad, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ficoll-Paque Plus (< 0,012 ng/ml)	Amersham, Uppsala, Schweden
Gadolinium (III) chloridhydrat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glycerol 100%	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Hoechst 33342	MolecularProbes/Invitrogen, Eugene, USA
Kupfersulfatlösung 4%	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Laemmli Puffer 2x	BioRad, München
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) 20%	BioRad, München
Oligo-(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen, Karlsruhe
PeqGold Prestained Protein-Marker IV	Peqlab, Erlangen
PeqGold Trifast	Peqlab, Erlangen
Proteinstandard für BCA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Saponin from quillaja bark	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Transferpuffer	BioRad, München
Tween 20	Merck, Darmstadt
Tris	USB, Cleveland, USA
Trypanblaulösung	Fluka/Sigma Aldrich, Taufkirchen

Alle weiteren nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Sigma Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.4 Puffer, Zellkulturmedien und Zusätze

Puffer	Hersteller
FACSClean	BD Biosciences, Heidelberg
FACSflow	BD Biosciences, Heidelberg
FACSRinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Cölbe
Hank's buffered salt solution (HBSS)	PAA, Cölbe
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
SuperBlock Blocking Buffer	Thermo scientific, Rockford, USA
Trypanblaulösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Bezeichnung	Inhaltsstoff	Menge
Elektrophoresepuffer	Tris/HCl, pH8,3	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 %
	in Aqua dest.	
ELISA-Waschpuffer	PBS	1x
	Tween 20	0,05 %
MACS-Puffer	EDTA	2 mM
	BSA	0,5 %
	in PBS	

PBS (<i>Phosphat buffered saline</i> , 10x), pH 7,4	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	10,3 mM
	NaCl	137 mM
	KCl ₂	2,7 mM
	in Aqua dest.	
Stripping-Puffer	2-Mercaptoethanol	100 mM
	SDS	2 %
	Tris/HCl, pH 6,7	62,5 mM
	in Aqua dest.	
TBS (<i>Tris buffered saline</i> , 10x)	Tris/HCl pH 7,6	0,2 M
	NaCl	1,37 M
	in Aqua dest.	
TBST	TBS	1x
	Tween 20	0,1 %
	in Aqua dest.	
Transferpuffer	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %
	in Aqua dest.	

2.1.5 Peptide und Stimulanzen

Peptid / Stimulans	Hersteller
FK506	Alexis Biochemicals, Redfern, Australien
IL-2, rekombinant murin	PeproTech Inc., Rocky Hill, USA
IL-4, rekombinant murin	PeproTech Inc., Rocky Hill, USA
IL-13, rekombinant murin	PeproTech Inc., Rocky Hill, USA
Magnevist®	Bayer Schering, Berlin
Rapamune	Wyatt, Berkshire, UK
Sandimmun	Novartis, Nürnberg
TNF- α , rekombinant murin	PeproTech Inc., Rocky Hill, USA
IFN- γ , rekombinant murin	PeproTech Inc., Rocky Hill, USA

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper für FACS, ELISA, Western-Blot, Immunhistologie und Zellkultur

Spezifität	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
CD3	145-2C11	Ratte	NA/LE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD4	RM4-5	Ratte	APC	BD Biosciences, San Jose, USA
CD11b	M1/70	Ratte	FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
CD11b	M1/70	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD11c	HL3	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD16/32	2.4G2	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD19	1D3	Ratte	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD45	30-F11	Ratte	FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
CD45	OX-1	Maus	PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD115	AFS98	Ratte	PE	eBioscience, San Diego, USA

GAP-DH		Kaninchen		Cell Signaling, Danvers, USA
Gr-1	RB6-8C5	Ratte	APC	BD Biosciences, San Jose, USA
IL-2	JES6-1A12	Ratte		R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-4	30340.11	Ratte		R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-21		Ziege		R&D Systems, Minneapolis, USA
INF- γ	H22	Ratte		R&D Systems, Minneapolis, USA
Kollagen I		Kaninchen	Biotin	Rockland, Gilbertsville, USA
Kollagen I		Kaninchen		abcam, Cambridge, UK
Kollagen I		Maus		Santa Cruz Biotechnologies, USA
TGF- β	1D11	Maus		R&D Systems, Minneapolis, USA
TNF- α		Ziege		R&D Systems, Minneapolis, USA

Sekundäre Antikörper und Isotypkontrollen

Spezifität	Herkunft	Konjugat	Hersteller
Maus	Ziege	HRP	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen	Ziege	Alexa Flour 594	Molecular Probes / Invitrogen, Eugene, USA
Kaninchen	Ziege	HRP	Cell Signaling, Danvers, USA
Streptavidin		APC	BD Biosciences, San Jose, USA
Streptavidin		HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Kaninchen IgG		Biotin	Rockland, Gilbertsville, USA

2.1.7 Microbeads

Name	Hersteller
CD4 Microbeads (Maus)	Miltenyi Biotect, Berg. Gladbach
CD19 Microbeads (Maus)	Miltenyi Biotect, Berg. Gladbach
CD45 Micorbeads (Ratte)	Miltenyi Biotect, Berg. Gladbach
PE Microbeads	Miltenyi Biotect, Berg. Gladbach
APC Microbeads	Miltenyi Biotect, Berg. Gladbach

2.1.8 Enzyme

Enzym	Hersteller
Kollagenase Typ I	Sigma Aldrich, Taufkirchen
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-freie DNase	Qiagen, Hilden

2.1.9 Kits

Kit	Hersteller
Avidin-Biotin-Blocking Kit	vector laboratories, Burlingame, USA
QuantiTect SYBR green PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Micro/Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.10 Primersequenzen

Die Auswahl der Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer erfolgte durch das Programm Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net>) anhand der publizierten genomischen

DNA- bzw. cDNA-Sequenzen in der Gendatenbank auf dem Server des National Centers for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov). Die vorgeschlagenen Sequenzen wurden anhand des Programms BLAST des NCBI auf Spezifität, potentielle Kreuzreaktivität und Identität geprüft. Soweit möglich wurden intronüberspannende Primer gewählt.

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen TipMolBiol (Berlin) und Operon Biotechnologies (Köln) synthetisiert.

Primer	Sense 5' → 3'	Antisense 5' → 3'
Kollagen I Maus	tgt tca gct ttg tgg acc tc	tca agc ata cct cgg gtt tc
Kollagen I Ratte	gtg gac ctc cgg ctc ctg ctc ctc	ctt ctg ggc aga aag gac agc act cgc
GAP-DH	gtc gtg gat ctg acg tgc c	gat gcc tgc ttc acc acc tt

2.1.11 Software

Software	Hersteller
CellQuest Pro	BD Bioscience, Heidelberg
LightCycler Software version 3.5	Roche, Mannheim
MetaMorph 4.6.9r	Universal Imaging (Visitron System, Puchheim)
Meta Vue 6.3r3	Molecular Devices, Downingtown, USA
MS Office 2007	Microsoft
SDS 2.2.3 software	Applied Biosystems, Darmstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Zellsuspensionen

Um das Absterben von Zellen zu vermeiden, wurde für die Präparation von Zellsuspensionen immer eisgekühltes RPMI 1640 Medium mit 10 % (vol/vol) FKS (fötales Kälberserum) oder eisgekühlte Puffer verwendet.

Vor der Zellpräparation wurden die Tiere durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet. Nach der Tötung wurden die Tiere mit 70 % Ethanol besprüht und die Organe steril entnommen.

2.2.1.2 Präparation von murinen Splenozyten

Nach der chirurgischen Entnahme der Milz wurde diese von umgebendem Gewebe und Fett befreit, zerkleinert und mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein Nylonsieb mit einer Maschenweite von 70 µm in eine Petrischale, in die 5 ml RPMI/10 % FKS vorgelegt wurde, zerrieben. Anschließend wurde mit 5 ml eisgekühltem RPMI/10 % FKS nachgespült. Die Zellsuspension wurde dann bei 1400 rpm/4°C für 6 min zentrifugiert. Darauf folgte ein weiterer Filterschritt mit RPMI/10% FKS über 40 µm Nylonsieb, um größere Partikel und Gewebeteile zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 6 min bei 1400 rpm/4°C wurde das Sediment entweder in Medium für die Zellkultur oder in MACS-Puffer für weitere Zellisolationsschritte aufgenommen. Alle Präparationsschritte erfolgten auf Eis.

2.2.1.3 Präparation von murinen Nierenzellen für die FACS-Analyse

Nach der chirurgischen Entnahme der Niere wurde diese von umgebendem Gewebe befreit und mit einer Schere zerkleinert. Die Gewebeteile wurden in 5 ml Hank's Puffer (HBSS) mit 1 mg/ml Kollagenase I aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Röhrchen mit den Gewebefragmenten mehrmals gevortext. Anschließend wurden die mit Kollagenase I anverdauten Nierestückchen mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Nylonsieb (70 µm) gedrückt, das anschließend mit 5 ml eisgekühltem HBSS gespült wurde. Die Zellsuspensionen wurden nach einem Zentrifugationsschritt (1400 rpm, 6min, 4°C) erneut über ein 40 µm Nylonsieb gefiltert, um

größere Partikel zu entfernen. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation. Das Sediment wurde in PBS aufgenommen und für die FACS-Analyse verwendet.

2.2.1.4 Präparation von murinem Nieren- und Milzgewebe für RNA- und Proteinisolation und Kryoschnitten

Die Organe bzw. einzelne Organteile wurden direkt nach der chirurgischen Entnahme sorgfältig von umgebendem Gewebe und Fett befreit und in einem 2 ml Reagiergefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Anfertigung von Gefrierschnitten oder der Isolation von RNA und Gesamtprotein wurden die Präparate bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.5 Magnetische Zellseparation

Bei dieser Trennmethode werden die Zellen von Interesse mit Mikropartikeln („Beads“) mit einem Durchmesser von 70 nm markiert. Das Prinzip beruht auf zwei Schritten: Im ersten Schritt werden die Eisenpartikel an die Zellen gebunden. Im zweiten Schritt wird die Zellsuspension an einem Magneten vorbeigeführt und separiert. Der wichtigste Bestandteil ist dabei ein starkes Permanentmagnet-System, in dessen Magnetfeld eine Trennsäule eingebracht wird. Diese Trennsäule besitzt eine Matrix aus eisenmagnetischen Kugeln. Das Permanentmagnet-System erzeugt in der direkten Umgebung der Drähte oder Kugeln bzw. in der Säule einen Feldgradienten, der um ein Tausendfaches größer ist als die von einem vergleichbaren einfachen Magneten erzeugten magnetischen Kräfte. Das MACS-System (*magnetic cell sorting*) kann entweder zur Anreicherung oder zum Ausschluss einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Dabei gibt es positive Anreicherungsmethoden, in welchen die Beads an die gewünschte Subpopulation gebunden werden, und negative Anreicherungsmethoden, in denen die auszuschließenden Zellpopulationen mit Beads markiert werden.

2.2.1.6 Aufreinigung und Ausschluss von T- und B-Zellen

Mit Hilfe des MACS-Systems (*magnetic cell sorting*) wurden CD4⁺ T- und CD19⁺ B-Zellen aus Zellsuspensionen frisch präparierter Mausmilzen durch positive Selektion aufgereinigt oder depletiert. Dazu wurden die Milzzellen mit 90 µl / 10⁷ Zellen MACS-Puffer versetzt und 15 min bei 4°C mit anti-CD4- oder anti-CD19-Microbeads (10 µl / 10⁷ Zellen;

Antikörper mit paramagnetischen Partikeln) inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift mit MACS-Puffer wurde die Zellsuspension über magnetisierbares Säulenmaterial (MS-Säulen) in ein starkes Magnetfeld geleitet. Dabei wurden die markierten Lymphozyten in der Säule zurückgehalten, nicht markierte Zellen verließen die Säule im Eluat. Das Eluat war nun frei von mit Beads beladenen CD4⁺ T- oder CD19⁺ B-Zellen. Anschließend wurden die Zellen auf die Vollständigkeit der Depletion mit einer FACS-Färbung überprüft.

Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurden die markierten Zellen mit MACS-Puffer aus der Säule gewaschen und nochmals auf eine neue Säule aufgetragen, um durch eine wiederholte Anreicherung die Reinheit zu erhöhen. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die T- und B-Lymphozyten mit einer FACS-Färbung auf ihre Reinheit hin untersucht. Die Reinheit der T- und B-Zellen betrug im Durchschnitt 90-95 %.

2.2.1.7 Aufreinigung und Ausschluss von Monozyten

Für den Ausschluss von Monozyten-Subpopulationen wurden frisch präparierte Milzzellen entweder für 20 min mit anti-CD16/32-PE, anti-CD11b-PE, anti-CD115-PE oder anti-Gr1-APC in MACS-Puffer bei 4°C gefärbt. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer wurden die gefärbten Zellen mit 80 µl bzw. 90 µl / 10⁷ Zellen MACS-Puffer versetzt und für 15 min bei 4°C entweder mit anti-PE- (20 µl / 10⁷ Zellen) oder anti-APC-Microbeads (10 µl / 10⁷ Zellen) beladen. Nach dem Waschen mit MACS-Puffer wurden die Zellen über LS-Säulen ins Magnetfeld geleitet. Die mit Beads markierten Zellen verblieben im Säulenmaterial, nicht markierte Zellen verließen die Säule im Eluat. Dieses Eluat wurde als Monozyten-freie Zellsuspension gewertet. Die Vollständigkeit der Depletion wurde mit einer FACS-Färbung untersucht.

Für die Aufreinigung der Monozyten-Subpopulationen wurden die mit Beads beladenen Zellen nach Entfernen der Säulen aus dem Magneten mit MACS-Puffer aus der Säule gewaschen und nochmals auf eine neue Säule aufgetragen, um die Anreicherung der Monozyten zu erhöhen. Anschließend wurde die Reinheit der Monozyten-Subpopulationen mit einer FACS-Färbung überprüft. Die Reinheit der Monozyten betrug durchschnittlich 70-80 %.

2.2.1.8 Aufreinigung von CD45⁺ Zellen aus Nieren- und Milzgewebe

Für die Isolation von CD45⁺ Zellen aus dem Nieren- und Milzgewebe von Ratten wurden, analog zum Verfahren in Mäusen, wie unter 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben, Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die frisch präparierten Zellen wurden in 90 µl / 10⁷ Zellen MACS-Puffer aufgenommen und für 15 min bei 4°C mit 10 µl / 10⁷ Zellen anti-CD45 Microbeads versetzt. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer wurden die Zellen über LS-Säulen im magnetischen Feld aufgereinigt. Die im Säulenmaterial verbleibenden CD45⁺ Zellen wurden nach Elution aus der Säule für 20 min bei 4°C unter Lichtausschluss mit einem Antikörper gegen CD45 markiert. Anschließend wurden mit Hilfe eines FACSaria Zellsortierers im Lymphozyten-Gate liegende Zellen, die auf ihrer Oberfläche stark CD45 exprimieren, sauber isoliert. Von den aufgereinigten CD45⁺ Zellen der Nieren und Milz wurde anschließend die mRNA isoliert. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mit einer FACS-Färbung kontrolliert.

2.2.1.9 Zellkultur

Die Kultivierung von *ex vivo* isolierten murinen Milzzellen erfolgte in 96-well-Flachbodenplatten in RPMI 1640 Medium mit 10 % (vol/vol) Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C in einer humiden Atmosphäre und 5 % CO₂. Zellkulturansätze wurden mindestens als Duplikate, in der Regel aber als Triplikate angesetzt.

2.2.1.10 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurden mikroskopisch durch Trypanblaufärbung bestimmt. Während vitale Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde aus den Zellsuspension ein Aliquot entnommen und mit gleichem Volumen Trypanblaulösung versetzt. Anschließend wurden in einer Neubauer-Zählkammer die lebenden Zellen innerhalb eines Großquadrates (= 16 Kleinquadrate) unter dem Phasenkontrast-Mikroskop ausgezählt. Es wurden immer mindestens zwei Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl aus dem Mittelwert berechnet.

Berechnung der Zellzahl:

$$z \text{ [Zellen/ml]} = Z \times V \times 10^4$$

Z = Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat (1mm²)

V = Verdünnungsfaktor

2.2.1.11 Kultivierung von Fibrozyten

Für die Kultur von Fibrozyten wurden 5×10^5 Gesamtsplenozyten, depletierte Splenozyten oder isolierte Monozyten in 250 µl Medium pro Zellkulturloch eingesetzt. Die Zellen wurden für 14 Tage inkubiert und anschließend für die Untersuchung mittels Durchflusszytometer oder zur Gewinnung von Gesamtzelllysat oder mRNA geerntet.

2.2.1.12 Herstellung von Überständen aktivierter CD4⁺ T-Zellen

Die polyklonale Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen erfolgte über die Zugabe von anti-CD3-Antikörpern zur Kultur in Anwesenheit von CD19⁺ B-Zellen, die zur Antigen-Präsentation dienten. Es wurden 5×10^5 CD4⁺ T-Zellen und 5×10^5 CD19⁺ B-Zellen in 250 µl Zellkulturmedium ausgesät und mit 0,5 µg/ml anti-CD3 versetzt. Nach 72 Stunden wurden ca. 200 µl des Zellkulturüberstandes pro Kulturloch mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung in der Fibrozytenkultur bei -20°C gelagert. Für „SN CyA“ wurde zusätzlich das Immunsuppressivum Cyclosporin A in einer Konzentration von 2 µg/ml zugegeben. FK506 für „SN FK506“ wurde in einer Konzentration von 250 ng/ml eingesetzt und Rapamycin für „SN Rapamycin“ in einer Konzentration von 40 ng/ml. In der Kultur mit isolierten Monozyten wurden 80 % (vol/vol) der verschiedenen T-Zellüberstände mit frischem Medium verwendet.

Blockierende Antikörper (siehe unter 2.1.6 Antikörper), die die Wirkung verschiedener Zytokine in den generierten Überständen oder in der Zellkultur direkt neutralisieren sollten, wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt. Hierfür wurden die Überstände der aktivierten T-Zellen 1 h mit dem Antikörper bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend für die Fibrozytenkultur verwendet.

Rekombinante Zytokine (siehe unter 2.1.5 Peptide und Stimulanzen) wurden in der Zellkultur soweit nicht anders beschrieben in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt.

Das chemische Element Gadolinium wurde als Gadolinium (III) chloridhydrat in einer Stammlösung von 1 mM in RPMI 1640 angesetzt und anschließend in einer Verdünnungsreihe von 3 bis 30 μ M in der Fibrozytenkultur benutzt. Das Gadolinium-haltige MR-Kontrastmittel Magnevist® wurde in der Fibrozytenkultur in einer Verdünnung von 1:1000-1:2000 mit Zellkulturmedium genutzt.

2.2.2 Bestimmung der Fibrozytenzahl

Zur Ermittlung der Anzahl der ausdifferenzierten Fibrozyten in der Zellkultur wurden nach 14 Tagen Kultur die spindelförmigen Zellen pro Haupt Gesichtsfeld (HPF) in der Zellkulturplatte ausgezählt. Hierfür wurden pro *well* drei Fotos mit einer Nikon D70s Digitalkamera bei einer 200fachen Vergrößerung am Durchlichtmikroskop (Axiovert25, Zeiss) angefertigt. Pro Zellkulturanatz wurden, wenn möglich, jeweils drei *well*s untersucht, so dass neun Gesichtsfelder pro Bedingung ausgezählt werden konnten. Als Kontrolle wurden immer unstimulierte Monozyten mitgeführt. Anschließend wurden die adhärennten Fibrozyten für weitere Untersuchungen geerntet.

2.2.3 Antikörperfärbung

2.2.3.1 Oberflächenfärbung

Im Verlauf der Arbeit wurden mit Hilfe von Antikörpern Oberflächen-Färbungen von Lymphozyten durchgeführt, um sie anschließend durchflusszytometrisch (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) zu charakterisieren. Die aufgereinigten Lymphozyten wurden mit der entsprechenden Antikörperlösung (siehe unter 2.1.6 Antikörper) in einem Volumen von 100 μ l für 20 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und für 6 min bei 1400 rpm/4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 200 μ l PBS resuspendiert und zur FACS-Analyse eingesetzt. Bei der Verwendung von biotinylierten Antikörpern erfolgte nach der ersten Antikörperfärbung eine sekundäre Färbung mit Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin. Anschließend wurden die sekundär gefärbten Zellen wiederum mit PBS gewaschen und für weitere 6 min bei 1400 rpm/4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 μ l PBS aufgenommen und zur FACS Analyse eingesetzt.

2.2.3.2 Intrazelluläre Färbung

Zur Analyse von nicht an der Zelloberfläche ausgeprägten Proteinen wurden im Verlauf der Arbeit auch intrazelluläre Antikörperfärbungen durchgeführt. In diesem Falle wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung mit 150 µl CytoFix/CytoPerm-Lösung (BD Biosciences) für 20 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Das in der Lösung enthaltene Paraformaldehyd führt zu einer Denaturierung und Präzipitation von Proteinen und deren Seitenketten. Es stabilisiert die Oberflächenantikörper und erhält ihre Fluoreszenz. Weiterhin wird durch enthaltene Detergenzien gleichzeitig eine Porenbildung an der Zelloberfläche vermittelt, die eine Bindung von Antikörpern an intrazelluläre Moleküle ermöglicht. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,1 % Saponinlösung gewaschen, um die Permeabilisierung der Zellen aufrechtzuerhalten und dann mit den intrazellulären Antikörpern in 0,1 % Saponinlösung für 20-45 min bei 4°C unter Lichtausschluss gefärbt. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 0,1 % Saponin wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und zur FACS-Analyse herangezogen.

2.2.3.3 Färbung von kultivierten Fibrozyten

Am Tag 14 der Kultur wurden die Fibrozyten nach dem Fotografieren der Zellen geerntet. Hierbei wurde das Medium abgenommen und die adhärennten Fibrozyten mit 150 µl 1,5 mM EDTA-Lösung für 15 min bei 37°C von der Kulturplatte gelöst. Es wurden die Zellen aller Löcher einer Bedingung vereinigt, um ausreichend Zellen für die FACS-Analyse zu erlangen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 6 min bei 1400 rpm/4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl PBS aufgenommen und mit anti-CD45-FITC für 20 min bei 4°C unter Lichtausschluss gefärbt. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Zellen zur Fixierung und Permeabilisierung für die intrazelluläre Kollagen I-Färbung in 150 µl CytoFix/CytoPerm aufgenommen und für 20 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit einer 0,1 %igen Saponinlösung gewaschen. An dieser Stelle wurden die Zellen auf zwei Röhrchen aufgeteilt. Die eine Hälfte der Fibrozyten wurde mit dem Biotin-gekoppelten Kollagen I-Antikörper markiert, die andere Hälfte mit dem biotinylierten Isotypen Kaninchen IgG, um nicht-spezifische Bindungen des Kollagen I-Antikörpers zu bestimmen, und für 20 min bei 4°C im Dunkeln gehalten. Nach zweimaligem Waschen mit 0,1 % Saponin wurden die Proben mit Streptavidin-APC für 20 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden die Fibrozyten nochmals zweimal mit 0,1 %

Saponinlösung gewaschen und das Zellpellet hinterher in 200 µl PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch vermessen.

2.2.3.4 Färbung von Fibrozyten aus frischem Gewebe

Die Einzelzellsuspensionen von Nieren- oder Milzgeweben wurden in FACS-Röhrchen aufgeteilt. Dabei wurden die Zellen einer halben UUO-Niere, ein 1/5 einer gesunden Niere oder ein 1/5 der Milz in 100 µl PBS aufgenommen und mit anti-CD45-FITC und anti-CD11b-PE für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Darauf folgten zwei Waschschrte mit PBS und die Behandlung der Zellen mit 150 µl CytoFix/CytoPerm bei 4°C unter Lichtausschluss für 20 min zur Vorbereitung auf die intrazelluläre Kollagen I-Färbung. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,1 % Saponinlösung gewaschen und in einem Volumen von jeweils 150 µl auf zwei Röhrchen aufgeteilt. Somit konnte die eine Hälfte der Zellen mit einem biotinylierten anti-Kollagen I-Antikörper und die andere Hälfte zur Kontrolle mit der Biotin-gekoppelten Isotyp-Kontrolle Kaninchen IgG für 45 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt werden. Die Antikörper bzw. die Isotyp-Kontrolle wurden hierbei in 0,1 % Saponin verdünnt. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit 0,1 % Saponin und die Behandlung der Zellen mit Streptavidin-APC (verdünnt in 0,1 % Saponin) für 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit 0,1 % Saponin wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.4 Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung/Durchflusszytometrie

Allgemeines Prinzip

Die FACS-Messungen erfolgten an einem FACSCalibur der Firma Becton Dickinson. In FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Geräten kommt die Technik der Durchflusszytometrie zur Anwendung. Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Dafür werden die Zellen in die partikelfreie schnell fließende Trägerflüssigkeit des Durchflusszytometers gebracht. Dabei werden sie einzeln hintereinander aufgereiht und fließen durch einen scharf gebündelten Laserstrahl. Jede Zelle erzeugt Signale durch Streuung des Lichts und die Emission von Fluoreszenz. Über Linsen, Spiegel und Filtersysteme wird die Strahlung auf Photodetektoren geleitet und verstärkt (Abb. 3). Im *forward scatter* (FSC) wird das Vorwärtstreulicht erfasst, das im

180°-Winkel durchgelassen wird. Es gibt Informationen über die Größe der Zellen, während das im 90°-Winkel gemessene Seitwärtsstreulicht, erfasst im *side scatter* (SSC), Aussagen über die Granularität der Zellen erlaubt. Im Punktwolken-Diagramm (*dot blot*) stellen die Zellen distinkte Populationen dar, die dann für die Analyse über ein Gate eingrenzt werden können. Haben Fluoreszenzmoleküle an die Zelloberfläche gebunden, so werden diese von den Lasern (Argon-Ionen-Laser, $\lambda=488$ nm; roter Diodenlaser, $\lambda=635$ nm) angeregt und geben die absorbierte Energie in Form von Licht höherer Wellenlänge wieder ab. Dieses wird in den Detektoren in ein elektronisches Signal umgewandelt. Die emittierte Lichtmenge ist proportional zur Zahl der markierten Epitope. Dies bedeutet, dass die Lichtemission umso höher wird, je dichter die entsprechenden Antigene exprimiert werden. Da die Farbstoffe über unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren verfügen, bietet sich die Möglichkeit, verschiedene Epitope einer Zelle gleichzeitig zu markieren. Die Emission der Farbstoffe wird von einem FACSCalibur in vier Kanälen gemessen. Zusammengenommen können damit für jede Zelle sechs Parameter ermittelt werden.

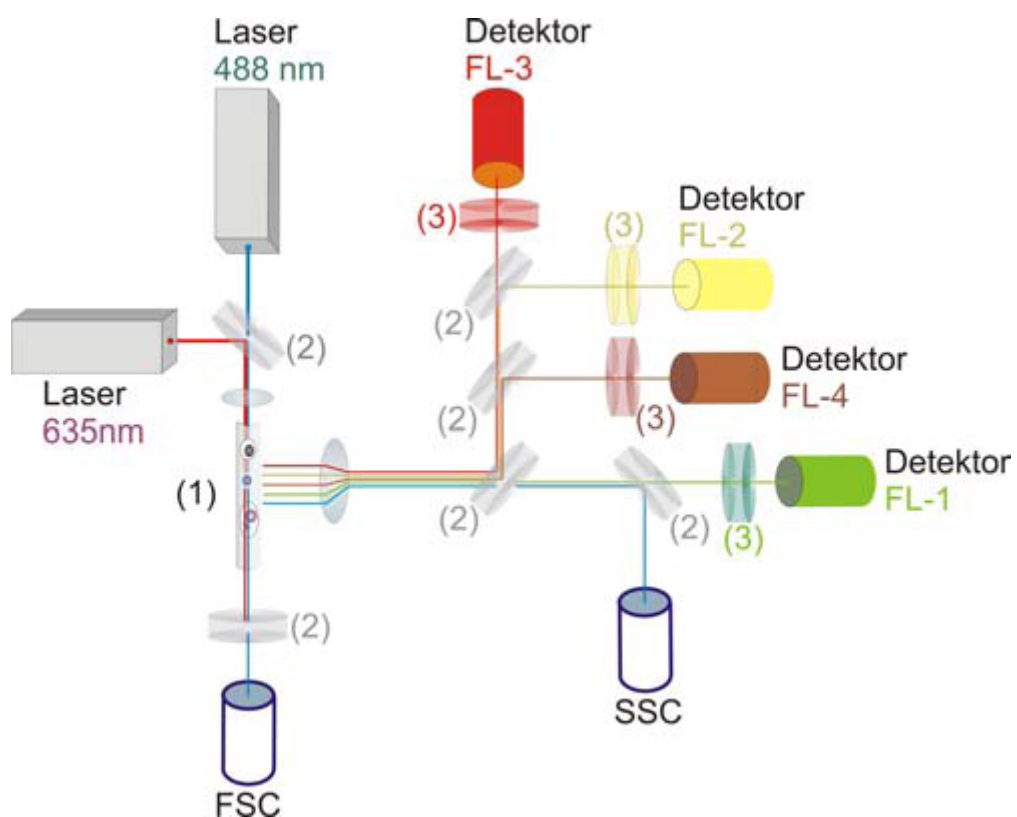


Abb. 3: Schematische Darstellung der Optik eines FACSCalibur. In der Messkammer (1) werden markierte Zellen durch die zwei Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge beleuchtet. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden angeregt, Licht charakteristischer Wellenlängen zu emittieren und das eingestrahlte Licht wird, abhängig von der Zellgröße und Granularität gestreut. Das reflektierte und emittierte Licht wird über verschiedene halbdurchlässige Spiegel (2) und verschiedene Filter (3) in separate Wellenlängenbereiche aufgeteilt und von Photoelektronenvervielfachern (Detektoren FL-1 bis FL-4) detektiert (Darstellung nach Katalog Becton Dickinson, 2004).

Die erfassten Daten wurden in Form einer korrelierten Zweiparameterdarstellung als Punktehistogramm (*dot plot*) abgebildet. Dieses zeigt die Relation von zwei verschiedenen Eigenschaften einer Zelle zueinander. Jeder Punkt steht dabei für eine bestimmte Zelle mit ihren beiden Eigenschaften. Eine Zweifarbenanalyse beispielsweise erfolgte dabei durch logarithmisches Auftragen der beiden Fluoreszenzintensitäten gegeneinander (Abb. 4). Auf diese Weise lassen sich Subpopulationen charakterisieren und identifizieren. Zur quantitativen Auswertung verschiedener Zellpopulationen und Subpopulationen wurden Grenzen anhand der Kontrollmessungen (Isotyp-Kontrolle) gesetzt.

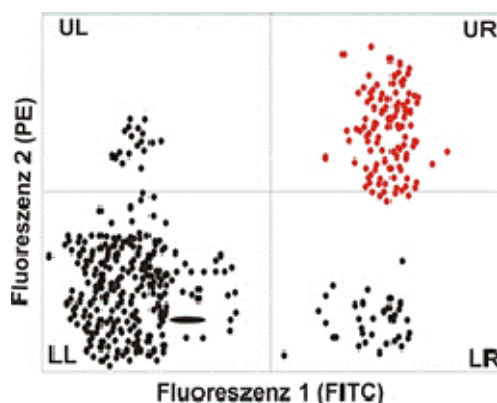


Abb. 4: Schematische Darstellung eines dot plots für zwei Fluoreszenzen (FITC und PE). UL, upper left (oben links); UR, upper right (oben rechts); LL, lower left (unten links); LR, lower right (unten rechts). Im LL: Autofluoreszenz; LR: nur FITC-gefärbte Zellen; UL: nur PE-gefärbte Zellen; UR: doppelt positive Zellen.

2.2.5 ELISA (Enzymimmunoassay)

Die ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)-Technik basiert auf dem Antikörper-Sandwich-Prinzip. Man erfasst damit quantitativ Antigen- oder Antikörperkonzentrationen. Dabei werden 96-well-Mikrotiterplatten mit einem gegen die zu bestimmende Substanz gerichteten mono- bzw. polyklonalen Antikörper (immunosorbent) beschichtet (vgl. Abb. 5 (1)). Anschließend werden diesen Platten die Proben, Standards und Kontrollen zugegeben, wobei die zu bestimmende Substanz von den Antikörpern gebunden wird (2). Nach Inkubation und Waschschritten wird ein zweiter polyklonaler enzymgekoppelter

Antikörper, der sogenannte Detektionsantikörper, zugegeben (3/4). Durch die wiederholten Waschvorgänge werden die nicht hochaffin gebundenen Proteine entfernt. Es folgt eine zweite Inkubation und weitere Waschvorgänge, nach welchen die Mikrotiterplatten mit einer Chromogenlösung beschichtet werden, die wiederum mit dem Enzym reagiert. Durch die Zugabe einer Säurelösung wird die Farbreaktion gestoppt und die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen, wobei die Absorption der Konzentration der zu bestimmenden Substanz direkt proportional ist (5).

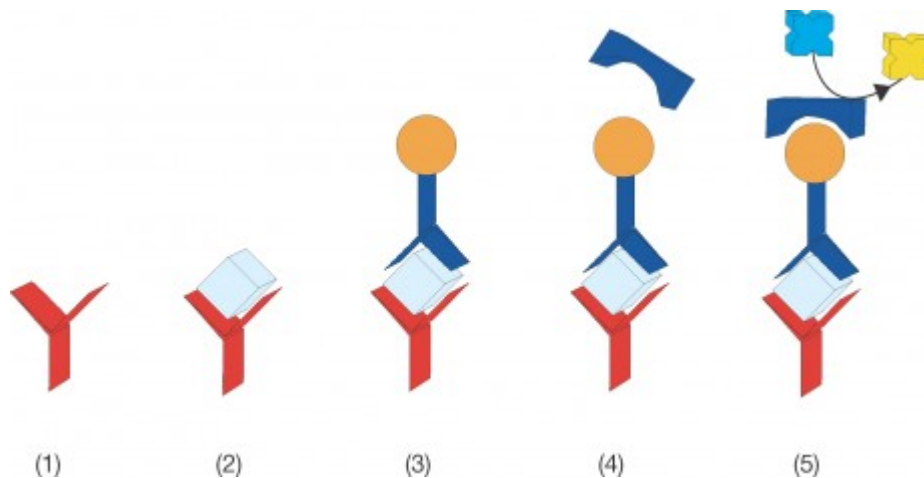


Abb. 5: Allgemeines Prinzip der ELISA-Technik. (1) Die Mikrotiterplatte wird mit dem „Fangantikörper“ beschichtet; (2) die Proben werden zugegeben und das jeweilige Antigen bindet an den Fangantikörper; (3) der biotinylierte Detektionsantikörper wird zugegeben und bindet an das Antigen, das durch den Fangantikörper immobilisiert wurde; (4) Streptavidin-HRP bindet an den Biotin-konjugierten Detektionsantikörper; (5) in einer Farbreaktion kann der Gehalt an Antigen in der Probe gemessen werden.

2.2.5.1 Nachweis von intrazellulärem Kollagen I im Zelllysate von Fibrozyten per ELISA

Herstellung der Fibrozyten-Zelllysate

Am Tag 14 der Fibrozytenkultur wurden alle Zellen, adhärenente und nicht adhärenente, mit 1,5 mM EDTA für 15 min bei 37°C aus der Zellkulturplatte gelöst und die Zellen einer Bedingung zu einer Probe vereint. Die Zellen wurde mit PBS gewaschen und anschließend für 6 min bei 1400 rpm/4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in Na-Acetat-Puffer aufgenommen und die Zellen wurden zweimal für 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Bis zur weiteren Vermessung wurden die Zelllysate bei -80°C gelagert. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte nach der Methode von Pierce (siehe unter 2.2.6.5 Proteingehaltsbestimmung). Mit Na-Acetat-Puffer wurden die Zelllysate im

Vergleich zur Kontrolle auf gleiche Proteinkonzentrationen verdünnt und im Kollagen I-spezifischen ELISA vermessen.

Mikrotiterplatten wurden zur Immobilisierung der Kollagen I-Moleküle mit einem Kollagen I-spezifischen „Fangantikörper“ (abcam, Cambridge) in einer Konzentration von 10 µg/ml über Nacht bei 4°C beschichtet. Alle Schritte des *Sandwich-ELISAs* wurden daraufhin bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde nach jeder Inkubationsphase fünfmal mit PBS gewaschen. Nachdem die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Plastikoberfläche für zwei Stunden mit 2 % (wt/vol) BSA in PBS blockiert worden waren, wurden 50 µl der verschiedenen Zelllysate für zwei Stunden hinzugegeben. Durch 4-stündige Inkubation mit einem biotinyliertem Kollagen I-Antikörper und einer anschließenden 60-minütigen Inkubation mit einem 1:1000 verdünnten Streptavidin-HRP-Konjugat wurde das enthaltene Kollagen I detektiert. Der Antikörper sowie das Streptavidin wurden in Blockierungspuffer verdünnt. Der Nachweis erfolgte durch die Oxidation des chromogenen Peroxidase-Substrats ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzothiazolin-sulfonat]) zu einem grünen Reaktionsprodukt. Durch die darauffolgende Messung der optischen Dichte am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm wurde der Versuch ausgewertet. Als Leerwert wurde die Extinktion von Na-Acetat-Puffer gemessen. Alle anderen Messwerte wurden entsprechend um diesen Leerwert korrigiert und sind als Absorptionswerte (A_{450}) dargestellt.

2.2.5.2 Nachweis von sezerniertem Kollagen I in der Kulturplatte per ELISA

Kollagen I ist Teil der extrazellulären Matrix und wird somit nach seiner Synthese aus der Zelle in den extrazellulären Raum entlassen. Dieses von Fibrozyten ausgeschiedene Kollagen I haftet sich an die Zellkulturplatte an und kann in einem ELISA-Verfahren mit Kollagen I-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Hierfür wurden die adhärennten Fibrozyten mit 1,5 mM EDTA für 15 min bei 37°C von der Kulturplatte gelöst und die einzelnen *well*s einmal mit PBS gewaschen. Anschließend folgte eine Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Platte mit 4 % (wt/vol) BSA in PBS bei 4°C über Nacht. Nach drei Waschschritten mit ELISA-Waschpuffer folgte eine Inkubation mit einem biotinylierten Kollagen I-Antikörper für 5 h. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Für die Detektion des sezernierten Kollagens I wurde ein HRP-gekoppeltes Streptavidin in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt, das die

Oxidation des chromogenen Substrats ABTS zu einem grünen Reaktionsprodukt katalysiert. Die optische Dichte wurde an einem ELISA-Reader nach 10 und 60 min bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm vermessen. Als Leerwert wurde die Extinktion eines nur mit PBS gewaschenen leeren Zellkulturlochs gewählt und alle anderen Messwerte um diesen Wert korrigiert.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNA-Isolation

Gesamt-RNA aus murinen Geweben wurde nach einer Modifikation der Methode von Chomcynski und Sacchi mittels Phenol-Choloform-Extraktion unter Verwendung von peqGOLD TriFast laut der Empfehlung des Herstellers isoliert. Hierfür wurden die gefrorenen Organteile (bis zu 100 mg Gewebe) mit 1 ml TriFast überschichtet, mit einem Stabhomogenisator zerkleinert und zur vollständigen Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe für weitere 5 min bei RT inkubiert. Trifast enthält Phenol und Guanidinisothiocyant in einphasiger Lösung. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf. Dabei ist die RNA in der wässrigen Phase enthalten, DNA in der Interphase und organischen Phase und Proteine in der organischen Phase. Die obere, wässrige RNA-enhaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen und in neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Die untere phenolische Phase sowie die Zwischenphase wurden bis zur Aufreinigung der Proteine bei -20°C aufbewahrt. Aus der wässrigen Phase konnte nun durch Zugabe von Isopropylalkohol die RNA gefällt werden. Um kontaminierende Salze herauszulösen, wurde das RNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für 10 min an der Luft getrocknet und in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

Bei geringeren Zellzahlen und kultivierten Fibrozyten wurde das RNeasy System von Qiagen zur Isolierung der RNA gewählt. Entsprechend der Zellzahlen wurde das RNeasy Mini oder MicroKit gewählt und nach Anleitung des Herstellers die mRNA isoliert. Diese Methode der RNA-Isolation beruht auf einer spezifischen Aufreinigung der RNA über hydrophile Silizium-Gelsäulchen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme. Die Zellen wurden in einem Guanidiniumisothiocyant enthaltenen Puffer durch auf- und abpipettieren lysiert. Das chaotrope Salz denaturiert sämtliche Proteine inklusive RNasen und gewährt somit die Isolation von intakter, nicht degradierter RNA. Anschließend wurde das Zelllysats mit Ethanol versetzt und durch eine auf Kieselgel basierende Säule zentrifugiert, wobei die RNA an das Säulenmaterial adsorbiert. Nach Waschschritten und

Verdau von begleitenden DNA-Verunreinigungen mit Hilfe von DNase I wurde die RNA in Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Anschließend wurden alle RNA-Proben im NanoDrop® (ND-1000 UV/VIS Spektralphotometer) photometrisch quantifiziert. Der Quotient der Absorption bei 260 nm (Nukleinsäuren) zur Absorption bei 280 nm (Proteine) diente als Maß für die Reinheit der Präparation. Im Idealfall (reine RNA) ist das Verhältnis (260:280) gleich 2.

Bei sämtlichen Vorgängen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNAsen Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet. Bis zur weiteren Verwendung für die Reverse Transkription wurden die RNA-Proben bei -20°C gelagert.

2.2.6.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) verwendet. Sie synthetisiert cDNA als DNA-Kopien eines RNA-Moleküls. Die erhaltene cDNA diente als Template für die spätere quantitative PCR. Ausgegangen wurde von 2 µg Gesamt-RNA, welche in nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 9 µl verdünnt wurde. Nach Zusatz von 1 µl oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primern (0,5 µg) wurde der Ansatz für 3 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden zusätzlich 4 µl first strand Transkriptionspuffer (5x), 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP), 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) und 1 µl RNase freies Wasser zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte 60 min bei 37°C. Um das Enzym zu inaktivieren wurde der Reaktionsansatz anschließend für 2 min auf 95°C erhitzt. Die erhaltene cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt und bis zur Verwendung für die quantitative PCR bei -20°C gelagert.

2.2.6.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (real-time PCR)

Bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch vermessen. Dies ermöglicht es, den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (*real-time*) zu verfolgen. Die quantitative Bestimmung des amplifizierten DNA-Produkts erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green. Dieser bindet mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA, wobei

gebundenes SYBR® Green 1000-fach stärker fluoresziert als freies und eine Signalintensität aufweist, die proportional zur entstehenden DNA-Menge ist.

Die PCR wurde mit dem QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit von Qiagen, das aus SYBR Green I dye, ROX passive reference dye, HotStarTaq DNA Polymerase und dNTP Mix besteht, an einem Light-Cycler System 2.0 oder einem ABI PRISM 7900HT detection system durchgeführt. Der 20 µl-Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 10 µl QuantiTect™ SYBR Green PCR Mastermix, je 10 pmol sense und antisense Primer, 6 µl RNase-freiem Wasser und 2 µl cDNA. Die Sequenz der verwendeten Primer ist im Materialteil unter 2.1.10 gelistet. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass sie nach Möglichkeit genau auf einer Intron-Exon-Grenze liegen, was eine Amplifikation von kontaminierender genomischer DNA verhinderte. Folgendes Amplifikationsprotokoll wurde verwendet: Nach anfänglicher Aktivierung der HotStarTaq™ DNA-Polymerase für 15 min bei 95°C folgten anschließend 40 Zyklen mit 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 30 s Annealingphase bei 57°C und 15 s Elongationsphase bei 72°C.

Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der synthetisierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Anhand der Schmelzkurven wurde die Spezifität der Amplifikation untersucht.

Die Effizienz E jedes PCR-Laufs wurde für jedes Primerpaar aus der Steigung einer aus vier Verdünnungen ermittelten Standardkurve errechnet ($E = 10^{-1/\text{slope}}$). Diese ergibt sich durch halblogarithmische Darstellung der Konzentration einer Verdünnung gegen die zugehörige Zyklenzahl, bei der die gemessene Fluoreszenz des PCR-Produkts eine definierte Größe hat. Abhängig von den verwendeten Primern lag die Effizienz zwischen 1,8 und 2,0.

Die Berechnung der relativen Mengen an cDNA erfolgte über die Standardkurve. Die erhaltenen Daten der Zielgene wurden auf die Expression von GAP-DH normalisiert. Bei diesem sog. *Housekeeping*-Gen wird davon ausgegangen, dass es in gleichen Organen verschiedener Tiere in konstanter Menge exprimiert wird. Durch diese Normalisierung sollen somit Schwankungen in der Konzentration der eingesetzten cDNA-Menge ausgeglichen werden, die durch unterschiedliche Effizienzen der cDNA-Synthese entstehen können.

2.2.6.4 Protein-Isolation

Die Isolierung des zellulären Gesamtproteins wurde aus der nach der RNA-Isolation zurückbehaltenen phenolischen Phase nach TriFast-Behandlung vorgenommen. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Durch Zugabe von Isopropanol zur organischen Phase konnten die Proteine ausgefällt werden. Zur Reinigung wurde das Proteinpellet dreimal mit 0,3 M Guanidinhydrochloridlösung (in 95 % Ethanol) und anschließend einmal mit 100 % Ethanol gewaschen. Nach der vollständigen Trocknung des Pellets wurde das Pellet in 1 % SDS gelöst und über Nacht bei 50°C geschüttelt. Durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 10 min wurden die Proben von unlöslichen Bestandteilen gereinigt und der Überstand in ein frisches Reagiergefäß überführt. Bis zur Vermessung und der weiteren Verwendung im Western-Blot wurden die Proteinproben bei -20°C gelagert.

2.2.6.5 Proteingehaltsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden mittels BCA-Methode nach Pierce bestimmt. Bei der sog. Biuret Reaktion wird unter alkalischen Bedingungen Cu^{2+} durch Proteine zu Cu^+ reduziert. Bei Zusatz von Bicinchromsäure (BCA) wird Cu^+ komplexiert. Peptidbindungen sowie Aminosäure-Reste wie Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan sind in der Lage, Cu^{2+} zu Cu^+ zu reduzieren und ermöglichen somit die Farbreaktion mit BCA. Es bildet sich ein lila Farbkomplex. Dieser kann durch eine photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden.

Zu 10 µl Gesamtproteinlysate wurden 200 µl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (Verhältnis BCA : Cu^{2+} = 50 : 1) in eine 96-Well Platte gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte in einem *E_{max} Microplate Reader* gegen das Reaktionsgemisch als Leerwert. Durch parallele Quantifizierung eines Protein-Standards konnte die Absorption in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden.

2.2.6.6 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert

deren positive Ladungen in einer Weise, dass alle Proteine ihrer Größe entsprechend zur Anode wandern. Nach LAEMMLI werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das eigentliche Trenngel ein.

Je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine werden Trenngele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen verwendet. Für den Nachweis von Kollagen I erwies sich ein 10 % Trenngel am geeignetsten. Die angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf zwei Minigele (8 x 7,3cm):

	Trenngel (10%)	Sammelgel
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 ml	
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8		1,25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
H ₂ O bidest	4 ml	2,8 ml
TEMED	5 µl	10 µl
30 % Acrylamid	3,3 ml	850 µl
10 % APS	100 µl	100 µl

Nach Zugabe von APS und TEMED wurde das Trenngel zwischen die mit Ethanol gereinigten Glasplatten gegossen und ein etwa 1,5 cm breiter Streifen für das Sammelgel frei gelassen. Die folgende Übersichtung mit Butanol garantierte eine exakte obere Kante bis das Gel nach 30 min polymerisiert war. Der Butanol wurde abgegossen und das Sammelgel nach Zugabe von APS und TEMED auf das Trenngel gegossen. Das Gel wurde nach Polymerisation des Sammelgels in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) aufgefüllt.

Die Proteinproben wurden vor dem Aufbringen auf das Gel mit mindestens dem gleichen Volumen eines 2-fach konzentrierten SDS-Probenpuffers versetzt und für 5 min im Heizblock bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt im Sammelgel bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA, damit die Proben langsam in das Sammelgel einwandern konnten und konzentriert wurden. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 60 mA und wurde direkt nach dem Auslaufen der Bromphenolblau-Bande gestoppt. Zur Überwachung der Proteinauftrennung und ungefähren Größenbestimmung der Proteine

wurde ein Proteinmarker verwendet, bei dem rekombinante Proteine kovalent mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelt sind (*prestained*).

2.2.6.7 Detektion von Kollagen I mit Hilfe monoklonaler Antikörper im Western-Blot

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf Nitrocellulose erfolgte im „semidry“-Verfahren. Das kurz in Transferpuffer äquilibrierte SDS-Gel und die Nitrocellulosemembran wurden hierfür zwischen einigen Lagen puffergetränktem Filterpapier direkt aufeinandergelegt und für 90 min zwischen den Elektrodenplatten platziert. Bei einer Stromstärke von 5 mA/cm² wandern die denaturierten Proteine, entsprechend ihres Molekulargewichts in Richtung Anode und werden auf der Nitrocellulose immobilisiert. Die Effizienz konnte anhand des aufgetragenen gefärbten Markers beurteilt werden.

Der Nachweis von Proteinen beruht auf der spezifischen Bindung eines primären monoklonalen Antikörpers und dessen Erkennung durch einen sekundären, Enzym-konjugierten Antikörper. Die chemische Reaktion durch das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase führt schließlich zu einer Anfärbung in der Umgebung des Proteins. Die Absättigung freier und unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran nach dem Proteintransfer erfolgte über Nacht bei 4°C mit einer 5 %igen Magermilch-TBST-Lösung. Danach wurde die Nitrocellulosemembran für 6 h bei RT mit einer 1:1000-Verdünnung des Kollagen I-Antikörpers (Santa Cruz) inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran viermal 10 min mit TBST gewaschen und eine Stunde mit einer 1:1000 Verdünnung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt. Nach erneutem Waschen folgte eine Inkubation mit dem Detektionssystem ECL Plus für 1 min. Durch dieses System können Proteine durch Chemilumineszenz detektiert werden. Es besteht aus einem PS-3 Acridan Substrat, das durch die HRP in einen Acridiniumester umgewandelt wird. Der Ester reagiert unter alkalischen Bedingungen mit Peroxid und emittiert Licht. Dieses wurde mit einem Hyperfilm autoradiographisch dokumentiert. Der Film wurde in einem Automaten (Curix 60, Agfa, Köln) entwickelt. Alle Inkubationsschritte wurden unter Schwenken auf einem Kreisschüttler durchgeführt. Die Quantifizierung der Signale wurde mit der MetaMorph 4.6.9r *software* von Universal Imaging (Visitron Systems, Puchheim, Germany) durchgeführt.

Für die anschließende Detektion des *Housekeeping*-Proteins GAP-DH auf der gleichen Membran war ein Entfernen der gebundenen primären und sekundären Antikörper der ersten Immunoreaktion durch „Strippen“ erforderlich. Dazu wurde die Membran für 30 min bei 60°C in Stripping-Puffer inkubiert und anschließend viermal 10 min in TBST gewaschen. Die Membran konnte nun erneut geblockt und wie oben beschrieben mit Antikörpern gegen GAP-DH inkubiert werden.

2.2.7 Versuchstiere

Stamm	Alter/Gewicht	Herkunft
C57BL/6 N@RJ	8-12 Wochen	Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, Frankreich
Balb/c AnN CrI	8-12 Wochen	Charles River, Sulzfeld
CB17/lcr-Prkdc scid	8-12 Wochen	Charles River, Sulzfeld
Lewis Ratten LEW/CrI	200 g	Charles River, Sulzfeld

Es wurden ausschließlich weibliche Tiere für die Experimente verwendet, die unter konventionellen Bedingungen bei konstanter Raumtemperatur von 21°C±2°C, einer konstanten relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % und bei einem kontrollierten Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden in den Tierställen des Universitätsklinikums Regensburg gehalten wurden. Die Tiere erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

2.2.8 Einseitige Ureterligatur (*unilateral ureteral obstruction, UUO*)

Durch intraperitoneale Injektion von Fentanyl, Midazolam und Medetomidin wurde die Narkose (siehe Tab. 1) eingeleitet. Nachdem keine Schmerzreaktionen der Mäuse mehr zu beobachten waren, wurden die Tiere auf den Rücken gelegt und die Bauchdecke mit einer Mischung aus 100 % Ethanol mit 30 % Glycerin bestrichen. Es folgte ein kleiner medianer Abdominalschnitt, der die Blase und den Harnleiter aufdeckte. Der linke Harnleiter wurde vorsichtig unter mikroskopischer Kontrolle vom umgebenden Gewebe freigelegt und an zwei Stellen mit einem nicht resorbierbaren Baumwollfaden abgebunden. Der Verschluss der abdominalen Wand erfolgte in zwei Schritten mit

separaten Nähten. Dabei kamen Einzelknopfnähte für die tiefere Muskelnäht mit einem 4-0 nicht-resorbierbaren Prolene Nahtmaterial, für die oberflächliche Hautnaht mit einem 3-0 resorbierbarem Vicryl Nahtmaterial zur Anwendung. Anschließend wurde die Wirkung der Narkose mit der subkutanen Gabe von Naloxon, Flumazenil und Atipamezol (siehe Tab. 1) vollständig antagonisiert. Der gesamte Eingriff dauerte durchschnittlich 15 min. Die Organentnahme fand bei Mäusen gewöhnlich am Tag 7 und bei Ratten am Tag 10 nach dem Eingriff statt.

Anästhesie	Maus	Ratte
Fentanyl	0,05	0,005
Midazolam	5,0	2,0
Medetomidin	0,5	0,15
Antagonisierung		
Naloxon	1,2	0,12
Flumazenil	0,5	0,2
Atipamezol	2,5	0,75

Tab. 1: Übersicht der Dosierungen (mg/kg KGW) der Anästhetika und deren Antagonisten bei Maus und Ratte.

2.2.8.1 Behandlung von UUO-Mäusen mit Interleukin-2 und Tumor Necrosis Faktor- α

Am Tag 0 wurde an 10 C57BL/6 Weibchen wie oben beschrieben eine einseitige Ureterligatur durchgeführt.

	Gruppe 1	Gruppe 2
PBS	200 μ l	
IL-2 + TNF-α		je 1 μ g/Tag

Vor Anatagonisierung der Narkose wurde der Gruppe 2 (n=5) 1 µg IL-2 und 1 µg TNF-α in 200 µl sterilem PBS subkutan unter das Nackenfell verabreicht. 5 weitere UUO-Mäuse erhielten eine Injektion mit PBS und wurden in Gruppe 1 als Vehikelkontrollen behandelt. An den Tagen 1-6 nach der UUO wurde den Tieren der Gruppe 2 zweimal täglich jeweils 500 ng IL-2 und 500 ng TNF-α in 200 µl PBS s.c. unter das Nackenfell appliziert. Am Tag 7 wurden nach zervikaler Dislokation die abgebundene Niere (UUO Niere) und die gegenseitige Niere (Kontrollniere) als interne Kontrolle sowie die Milz entnommen. Die Organe wurden für die einzelnen Analyseschritte geteilt. Von der Hälfte jedes Organes wurde eine Einzelzellsuspension wie unter 2.2.1.3 beschrieben für die Untersuchung mit dem Durchflusszytometer erstellt. Jeweils 1/4 der Organe wurden in flüssigem Stickstoff für die Isolation von RNA und Protein sowie die Herstellung von Kryoschnitten schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert (siehe 2.2.1.4).

2.2.8.2 Behandlung von UUO-Mäusen mit Cyclosporin A und anti-CD3

Am Tag 0 wurde an 15 C57BL/6 Weibchen wie oben beschrieben eine einseitige Ureterligatur durchgeführt. Die Tiere wurden wie folgt in 3 Gruppen eingeteilt.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Cyclosporin A		10 mg/kg/Tag	
Rapamycin			1,5 mg/kg/Tag
anti-CD3	1 µg/Tag	1 µg/Tag	1 µg/Tag

Die Gruppe 1 (n=5) diente als Kontrolle. Den UUO-Mäusen der Gruppe 2 (n=5) wurde über eine intraperitoneale Injektion 10 mg/kg Cyclosporin A (in Olivenöl gelöst) verabreicht. Gruppe 3 (n=5) wurde mit 1,5 mg/kg Rapamycin in Olivenöl behandelt. Gruppe 1 wurde zu diesem Zeitpunkt Olivenöl als Vehikelkontrolle verabreicht. 3 h später folgte eine Injektion mit 10 µg anti-CD3 Antikörper in sterilem PBS i.p. zur polyklonalen T-Zellaktivierung. Die Behandlung fand von Tag 0-6 statt. Am Tag 7 wurden den Tieren nach der Tötung durch Genickbruch die beiden Nieren entnommen und das Gewebe für eine Untersuchung mittels Durchflusszytometrie und die RNA- und Proteinanalyse präpariert.

2.2.9 Herstellung histologischer Schnitte aus kryokonserviertem Gewebe

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurde ein Teil des Nierengewebes in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Anfertigung der Gewebeschnitte bei -80°C aufbewahrt. Dieses wurde mit TissueTek Einbettmedium luftblasenfrei überschichtet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gewebepräparate wurden an einem Kryostat bei einer Kammertemperatur von -25°C mit einer Dicke von 5 µm geschnitten und auf SuperFrost® Plus Objektträgern platziert. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte in einem immunhistochemischen Verfahren gefärbt.

2.2.10 Immunhistochemische Färbung von Kollagen I

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation bestimmter intra- und extrazellulärer Proteine in Zellen und Gewebeschnitten durch spezifische Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind. Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zunächst der primäre, unkonjugierte Antikörper (Primärantikörper) an das Antigen im Gewebeschnitt. Anschließend werden die Schnitte mit einem zweiten, fluoreszierenden Antikörper (Sekundärantikörper), der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Dadurch wird der Antigen-Antikörper-Komplex detektierbar, wenn eine Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge erfolgt.

Die kryokonservierten Gewebeschnitte wurden in -20°C kaltem Aceton 7 min fixiert. Nach dem Trocknen bei RT wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einer hydrophoben Emulsion umrandet. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS für 5 min gewaschen und für 20 min in 3 % H₂O₂ in Methanol geblockt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit einem Avidin-Biotin-Blocking-Kit behandelt, nochmals zweimal mit PBS gewaschen und mit Superblock für 30 min blockiert. Daraufhin konnten die Schnitte nach einem Waschschrift mit PBS mit einem anti-Kollagen I Antikörper aus dem Kaninchen oder dem Isotyp-Antikörper (1:1000 verdünnt) über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Die Objektträger wurden dabei in einer feuchten, geschlossenen Kammer gelagert. Nachdem die Schnitte 3 x 3 min in PBS gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation des Gewebes mit dem Sekundärantikörper, einem AlexaFluor 594 konjugierten anti-Kaninchen IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 für 30 h bei RT in der feuchten Kammer. Erneut wurde dreimal für 3 min mit PBS gewaschen. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte durch eine anschließende Inkubation der Schnitte mit Hoechst

33342 (Trihydrochlorid-trihydrat) in einer Verdünnung von 1:50000 für 1 min. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium, einem Fluoreszenz-freien Glycergel, eingedeckelt.

3. Ergebnisse

Die genaue zelluläre Herkunft von Fibrozyten und ihrer Vorläuferzellen ist bislang noch nicht vollständig geklärt und nur wenige Faktoren, die zu einer gesteigerten oder verminderten Differenzierung der Fibrozyten führen, konnten bereits identifiziert werden. Um in diesem Zusammenhang neue Erkenntnisse zu erlangen, wurde ein *in vitro*-Modell mit murinen Splenozyten etabliert, um den Ursprung der Vorläuferzellen von Fibrozyten näher einzugrenzen und Signale, die deren Differenzierung in reife Fibrozyten beeinflussen, zu identifizieren.

3.1 Zellulärer Ursprung von murinen Fibrozyten

Um die Herkunft von Fibrozyten und ihrer Vorläuferzellen in Mäusen näher zu untersuchen, wurde die Entwicklung von Fibrozyten aus Gesamtsplenozyten und nach dem Ausschluss verschiedener Leukozyten-Subpopulationen aus der Gesamtheit der Splenozyten quantifiziert. Hierfür wurden Milzzellen der Maus für 14 Tage in RPMI-Medium mit 10 % hitze-inaktiviertem FKS kultiviert. Unter diesen Kulturbedingungen kam es zum Auswachsen spindelförmiger Zellen, die morphologisch dem Bild von Fibrozyten entsprechen (16) (Abb. 6).



Abb. 6: Fibrozyten aus Gesamtsplenozyten. Gesamtsplenozyten nach 14 Tagen Kultur in RPMI + 10 % FKS im Durchlichtmikroskop bei 200-facher Vergrößerung. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Kulturloch eingesät. Spindelförmige Zellen/Gesichtsfeld wurden ausgezählt.

In der durchflusszytometrischen Untersuchung bildeten diese Zellen eine weitgehend homogene Zellpopulation im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) (Abb. 8 A). Ein charakteristisches Merkmal für Fibrozyten ist die Expression extrazellulärer

Matrixproteine, im Besonderen die Expression von Kollagen Typ I (13). Die Expression von Kollagen I wurde u. a. durch eine intrazelluläre FACS-Färbung bestimmt (Abb. 8 B). Zur Bestimmung und Korrektur von nicht-spezifischen Bindungen wurde als Isotyp-Kontrolle für den Kollagen I-Antikörper Kaninchen IgG mitgeführt. So konnten eindeutig Kollagen I⁺ Zellen nachgewiesen werden. Die durchflusszytometrische Messung ergab weiterhin, dass diese kollagen I-positiven Zellen den Pan-Leukozytenmarker CD45, ein klassisches Merkmal für Fibrozyten, stark auf ihrer Oberfläche exprimieren (13) (Abb. 8 B). Mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie fand u. a. eine Quantifizierung der Zahl spindelförmiger Zellen pro Gesichtsfeld statt, indem die spindelförmigen Zellen von drei Gesichtsfeldern pro Zellkulturansatz ausgezählt wurden. Auf diese Weise zeigte sich, dass eine *in vitro*-Depletion von Zellen, die CD16/32, CD11b, CD115 oder Gr-1 auf ihrer Oberfläche tragen, zu einer deutlichen Verminderung der spindelförmigen Zellen führte (Abb. 7).

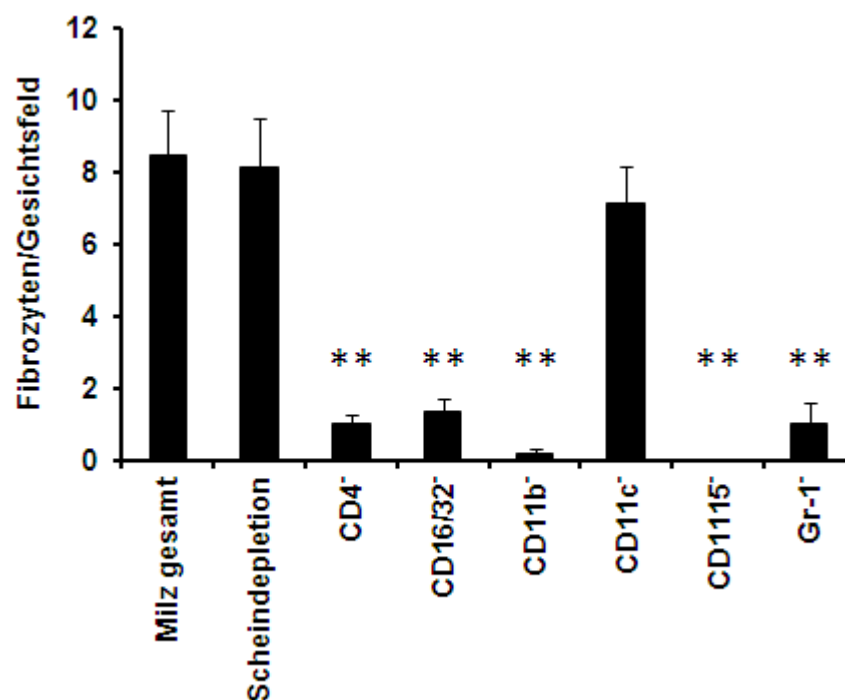
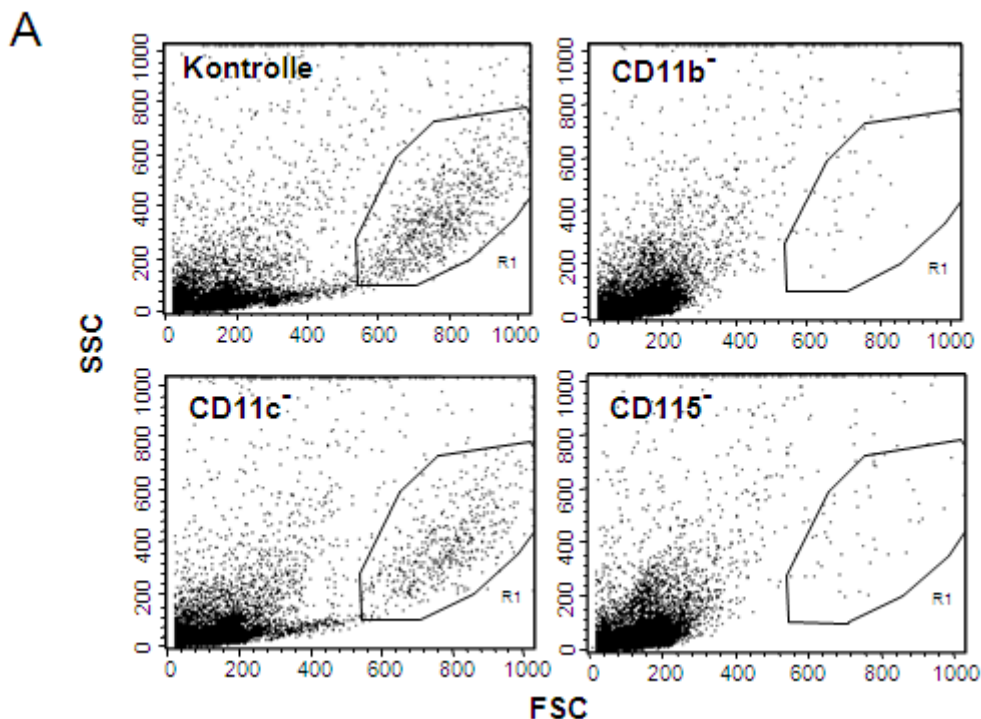


Abb. 7: Depletion verschiedener Leukozyten-Subpopulationen zur Identifizierung von Fibrozytenvorläufern. Gesamtsplenozyten und Splenozyten nach der Depletion von CD4⁺, CD16/32⁺, CD11b⁺, CD11c⁺, CD115⁺ oder Gr-1⁺ Leukozyten wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Kulturloch in RPMI + 10 % FKS kultiviert. Als Kontrolle wurden Gesamtsplenozyten (Milz gesamt) und schein-depletierte Splenozyten (Scheindepletion) mitgeführt. Am Tag 14 wurden die Zellkulturöcher fotografiert und die spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Scheindepletion bestimmt. $p < 0,01$ (**)

Der Ausschluss der einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen aus der Gesamtheit der Splenozyten erfolgte dabei mit Hilfe magnetischer Microbeads, die an Antikörper gegen verschiedene Antigene gekoppelt sind. Als Kontrollen wurden zum Einen Gesamtsplenozyten und zum Anderen schein-depletierte Zellen mitkultiviert. Bei einer Scheindepletion durchlaufen die Zellen die Prozedur des Zellausschlusses ohne den Einsatz von magnetischen Microbeads, so dass keine Zellen ausgeschlossen werden. Die Depletion von CD11c⁺ dendritischen Zellen oder CD19⁺ B-Zellen (Daten nicht gezeigt) hatten keinerlei Einfluss auf das Auswachsen von Fibrozyten. Die Marker CD16/32, CD11b und CD115 werden von Monozyten exprimiert, wobei das Adhäsionsmolekül CD11b und der M-CSF-Rezeptor CD115 als sehr spezifische Marker für Monozyten bei Mäusen gelten. Gr-1 wird auf einer Subpopulation von Monozyten exprimiert, die sich vor allem in entzündlichem Gewebe ansammelt (23-25). Durchflusszytometrische Untersuchungen bestätigten, dass nach der Depletion von CD11b⁺ oder CD115⁺, nicht aber von CD11c⁺ Zellen die typischerweise im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) erscheinende Population von Fibrozyten, die doppelt positiv für Kollagen I und CD45 ist, nicht auftritt (Abb. 8 A, B).



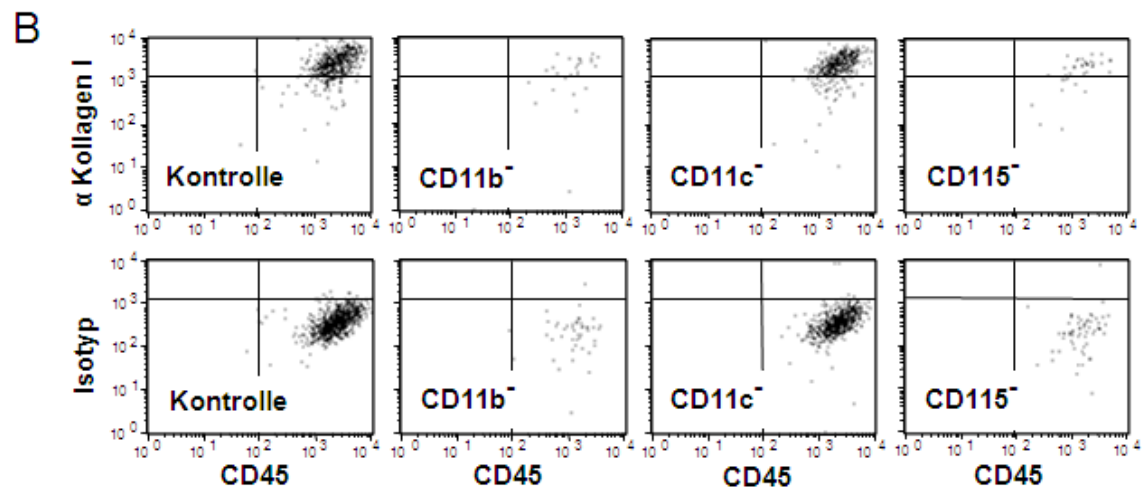


Abb. 8: FACS-Analyse nach Depletion verschiedener Leukozyten-Subpopulationen zur Identifizierung von Fibrozyten. Gesamtsplenozyten und Splenozyten nach der Depletion von CD11b⁺, CD11c⁺ und CD115⁺ Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Kulturloch in RPMI + 10 % FKS kultiviert. Am Tag 14 wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf ihre Eigenschaften im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) analysiert (A). Die Zellen wurden extrazellulär auf ihre Expression von CD45 hin und intrazellulär auf die Expression von Kollagen I im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle untersucht (B).

Weiterhin wurde die Expression von Kollagen I im Gesamtzelllysate von Fibrozyten mit Hilfe der ELISA-Technik nachgewiesen. Dabei bekräftigte die Quantifizierung von Kollagen I im Gesamtzelllysate die Aussage, dass der Gesamtgehalt an Kollagen I nach der Depletion von CD11b⁺ Zellen signifikant vermindert war (Abb. 9 B).

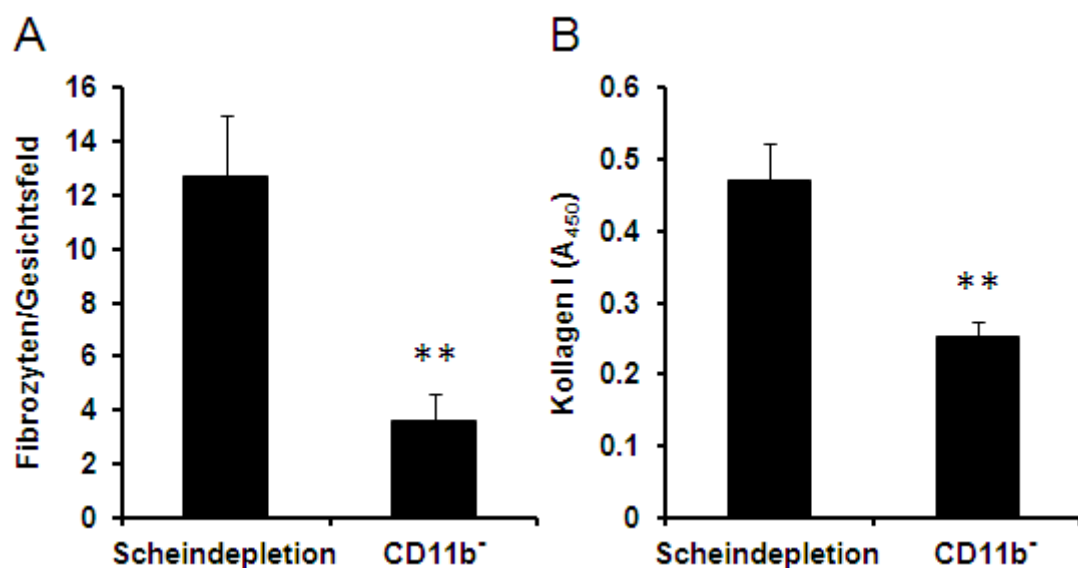


Abb. 9: Zellulärer Ursprung von Fibrozyten in Mäusen. Milzzellen nach Scheindepletion und dem Zellausschluss von CD11b⁺ Monozyten wurden in eine Dichte von 5×10^5 Zellen/Kulturloch in RPMI + 10 % FKS kultiviert. Am Tag 14 wurden die Zellen fotografiert und spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt (A). Anschließend wurden die Zellen geerntet und im Zelllysät mit Hilfe der ELISA-Technik der Gehalt an intrazellulärem Kollagen I quantifiziert (B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung bzw. als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Zelllysaten unabhängiger Zellkulturexperimente. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zum Wert der Scheindepletion bestimmt. $p < 0,01$ (**)

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich murine Fibrozyten aus einer CD16/32⁺, CD11b⁺, CD115⁺, Gr-1⁺ monozytären Subpopulation entwickeln. Weiterhin konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass nach der Depletion von CD4⁺ T-Zellen aus der Gesamtmenge der Milzzellen (nicht aber von CD8⁺ T-Zellen, Daten nicht gezeigt) die Zahl der ausgewachsenen, spindelförmigen Fibrozyten im Vergleich zur gesamten Milz stark vermindert war (Abb. 7).

3.2 Bedingungen, die die Fibrozytendifferenzierung unterstützen

Neben der Abstammung von Fibrozyten und ihren Vorläufern gehören Faktoren, die die Differenzierung der monozytären Vorläuferzellen in reife Fibrozyten in positiver wie negativer Weise beeinflussen, zum Hauptfeld unseres Interesses. Um nun die Bedingungen genauer zu untersuchen, unter denen Fibrozyten sich aus ihren monozytären Vorläufern entwickeln, wurden in den folgenden Versuchen aufgereinigte CD11b⁺ oder CD16/32⁺ Zellen verwendet. Die Isolation dieser monozytären Zellen wurde mit magnetischen Microbeads durchgeführt. Zur Kontrolle wurde anschließend eine Bestimmung des Reinheitsgrades mit dem Durchflusszytometer durchgeführt. Die Anreicherung der Monozyten lag durchschnittlich bei 80 %.

Aufgrund unserer Erkenntnisse aus den Depletionsversuchen war bekannt, dass ein Fehlen von CD4⁺ T-Zellen die Ausdifferenzierung von Fibrozyten nahezu vollkommen verhindert (Abb. 7). Umgekehrt steigerte die Zugabe von nicht-stimulierten CD4⁺ T-Zellen zu isolierten Monozyten die Entwicklung von spindelförmigen Fibrozyten merklich und bestätigte so die Relevanz von CD4⁺ T-Zellen als „Helferzellen“ für die Fibrozytenentwicklung (Abb. 10). Um diesen Einfluss der CD4⁺ T-Zellen und von diesen produzierten Faktoren auf die Differenzierung von Fibrozyten näher zu untersuchen, wurden Monozyten mit den Überständen von CD4⁺ T-Zellen kultiviert. Hierfür wurden T-Zellen 72 h lang polyklonal mit einem Antikörper gegen den CD3-Rezeptor, den alle T-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche exprimieren, aktiviert. Fand die Aktivierung der CD4⁺ T-

Zellen in Gegenwart des Calcineurin-Inhibitors Cyclosporin A statt, steigerte dieser Zellkulturüberstand (SN CyA) im Vergleich zu frischem Medium und zur Ko-Kultur mit $CD4^+$ T-Zellen deutlich die Fähigkeit von Monozyten, sich in einer 14-Tages-Kultur zu reifen Fibrozyten zu entwickeln. Diese vermehrte Entwicklung von Fibrozyten wurde einerseits in der Durchlichtmikroskopie sichtbar, die sich in einer erhöhten Zahl spindelförmiger Zellen pro Gesichtsfeld widerspiegelte (Abb. 10).

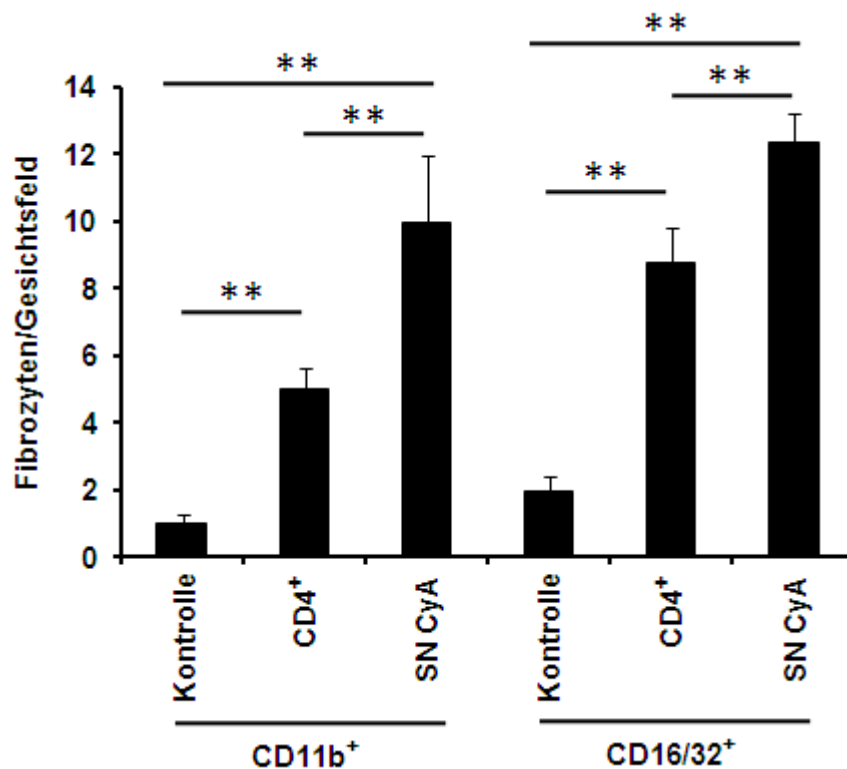


Abb. 10: $CD4^+$ T-Zellen unterstützen die Entwicklung von Fibrozyten. Isolierte $CD11b^+$ oder $CD16/32^+$ Monozyten wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Kulturloch mit Medium (Kontrolle), aufgereinigten $CD4^+$ T-Zellen (5×10^5) oder SN CyA (80 %) für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zum Wert der jeweiligen Kontrolle oder zur Kultur mit $CD4^+$ T-Zellen bestimmt. $p < 0,01$ (**)

Andererseits enthielt das Zelllysate der Fibrozyten, die sich in Kulturen mit SN CyA entwickelten, einen deutlich höheren Gehalt an Kollagen I als in frischem Medium kultivierte Monozyten. Die Menge an intrazellulärem Kollagen I stieg dabei um das Doppelte an (Abb. 11 A). Das von den Fibrozyten produzierte Kollagen I wird von diesen als extrazelluläres Matrixprotein sezerniert und lagert sich dabei an der Kulturplatte an. Dieses an der Zellkulturplatte haftende Kollagen I kann über einen Kollagen I-ELISA

nachgewiesen und quantifiziert werden. Auch hier schlug sich die gesteigerte Zahl an spindelförmigen Fibrozyten nach Kultur mit SN CyA in einer doppelt so hohen Menge an Kollagen I nieder (Abb. 11 B).

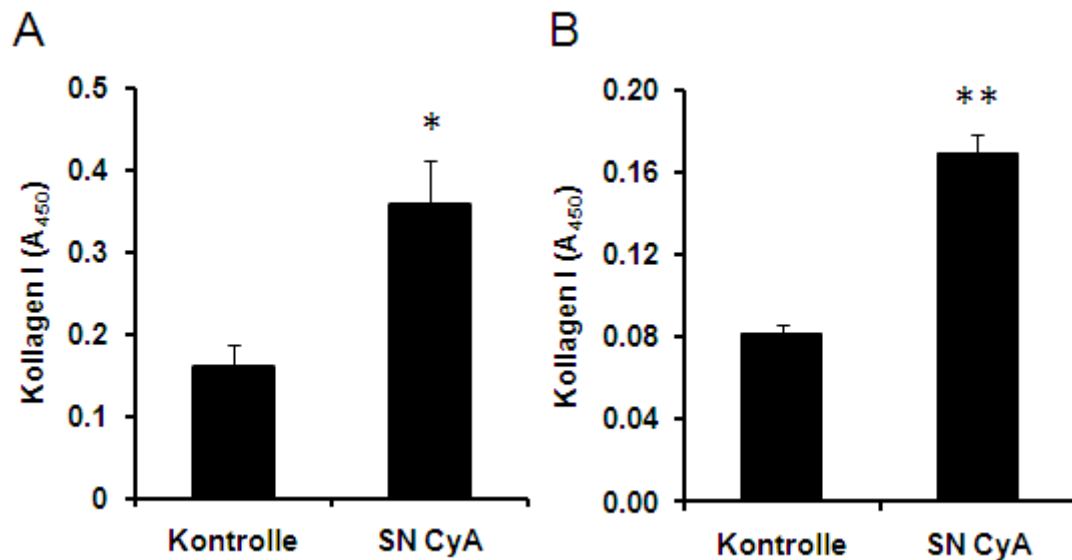


Abb. 11: Quantifizierung von intrazellulärem und sezerniertem Kollagen I mittels ELISA. Die Messung der Menge an intrazellulärem (A) bzw. sezerniertem Kollagen I (B) unter Kontrollbedingungen (frisches Medium) und nach Stimulation mit SN CyA (80%) nach 14 Tagen Kultur von CD11b⁺ Monozyten erfolgte im Zelllysät bzw. in der Zellkulturplatte mittels ELISA. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SEM aus 3 Zelllysaten unabhängiger Experiment bzw. als Mittelwerte ± SEM aus Triplikaten eines Zellkulturansatzes. Statistisch signifikante Unterschiede wurden jeweils zur Kontrolle ermittelt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

Die Expression von Kollagen I wurde zudem mit quantitativer real-time RT-PCR untersucht. Hierfür wurde die Gesamt-RNA von in frischem Medium und in SN CyA kultivierten Fibrozyten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR erfolgte mit spezifischen Primern gegen Kollagen I. Auch hier bestätigte sich die erhöhte Expression von Kollagen I, die sich in einem höheren Gehalt an Kollagen I-mRNA darstellte (Abb. 12).

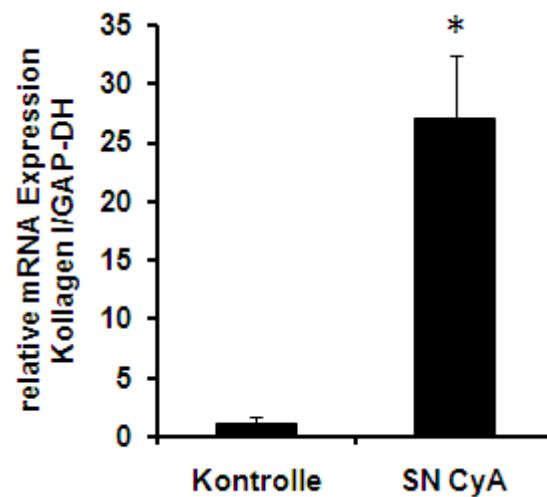
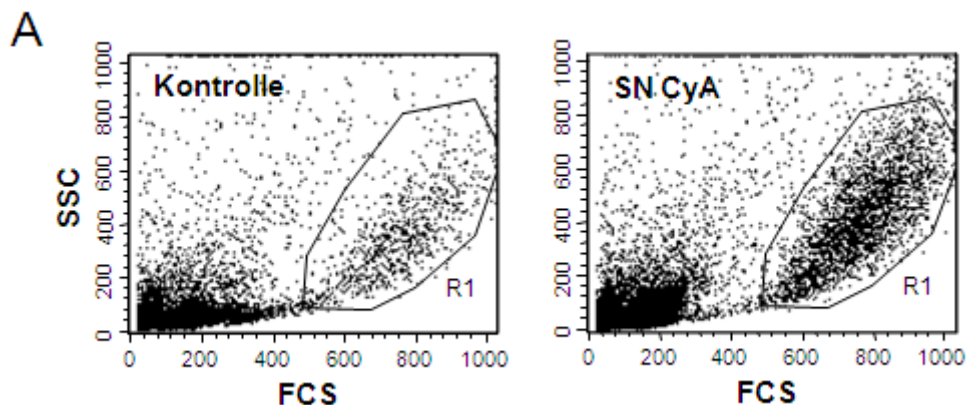


Abb. 12: Anstieg der mRNA-Expression von Kollagen I nach Stimulation mit SN CyA. CD11b⁺ Monozyten wurden unter Kontrollbedingungen (frisches Medium) oder mit SN CyA (80%) für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurde RNA isoliert und die Kollagen I-Expression mittels real-time RT-PCR analysiert. mRNA-Levels wurden auf GAP-DH normalisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrolle ermittelt. $p < 0,05$ (*)

Wurden Monozyten also SN CyA ausgesetzt, kam es zu einer gesteigerten Entwicklung von Fibrozyten, die sich auch in der durchflusszytometrischen Messung durch eine größere Zahl an Fibrozyten im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) bestätigte (Abb. 13 A). Diese Zellen waren positiv für die fibrozyten-typischen Marker CD45 und Kollagen I (Abb. 13 B).



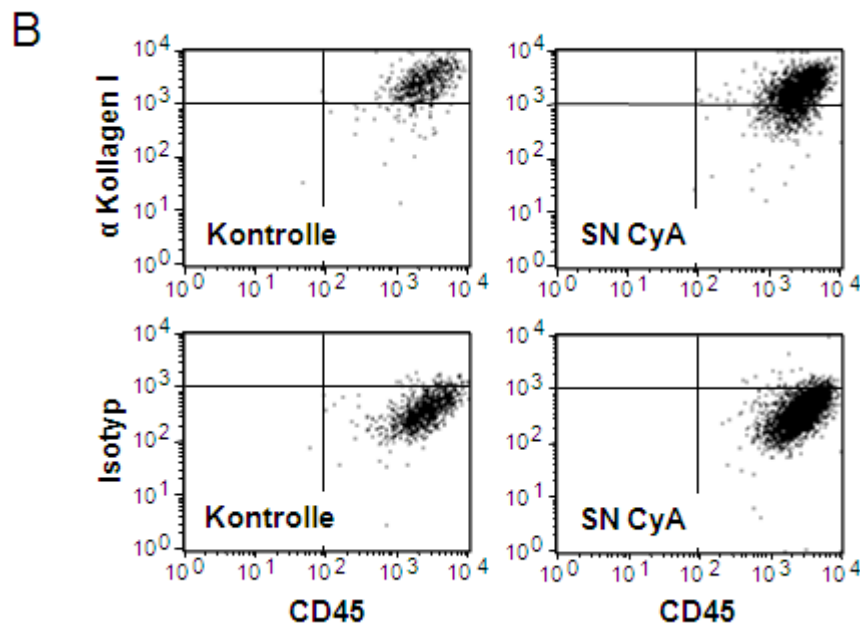


Abb. 13: FACS-Analyse von Fibrozyten nach Stimulation mit SN CyA. CD11b⁺ Monozyten wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Kulturloch für 14 Tage mit Medium (Kontrolle) oder SN CyA (80%) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf ihre Eigenschaften im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) untersucht (A). Die Zellen wurden extrazellulär auf die Expression von CD45 und intrazellulär auf die Expression von Kollagen I im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle analysiert (B).

Es stellte sich nun die Frage, ob Cyclosporin A die Bildung von Fibrozyten dadurch beeinflusst, dass es auf die T-Zellen wirkt und somit deren Produktion löslicher Faktoren verändert oder ob das in den Überständen enthaltene Cyclosporin A direkt auf die Monozyten wirkt. Um dies zu beantworten, wurden aufgereinigte Monozyten entweder mit den Überständen von in Gegenwart von Cyclosporin A aktivierten T-Zellen oder mit frischem Medium kultiviert, das dieselbe Konzentration an Cyclosporin A enthielt wie der SN CyA. Der Überstand SN CyA steigerte die Entwicklung von Fibrozyten erheblich während Cyclosporin A selbst keine signifikante Wirkung zeigte. Darüberhinaus wurden ein zweiter Calcineurin-Inhibitor (FK506) und der mTor-Inhibitor Rapamycin in die Versuchsreihe mitaufgenommen und auf die gleiche Weise untersucht. Die T-Zellüberstände, die in Anwesenheit von FK506 generiert wurden, steigerten ebenfalls die Entwicklung der spindelförmigen Fibrozyten aus ihren Monozytenvorläufern und führten somit zu einer vermehrten Ablagerung von Kollagen I in der Kulturplatte, während Überstände von T-Zellen, die Rapamycin ausgesetzt wurden, oder Rapamycin selbst die Differenzierung der Fibrozyten nicht begünstigten, sondern vielmehr sogar deren Entstehung verminderten (Abb. 14 A,B). Dies lässt den Schluss zu, dass Calcineurin-Inhibitoren die Freisetzung von löslichen Faktoren durch T-Zellen dahingehend

beeinflussen, dass sich in dieser Zusammensetzung vermehrt reife Fibrozyten aus ihren Vorläufern entwickeln können.

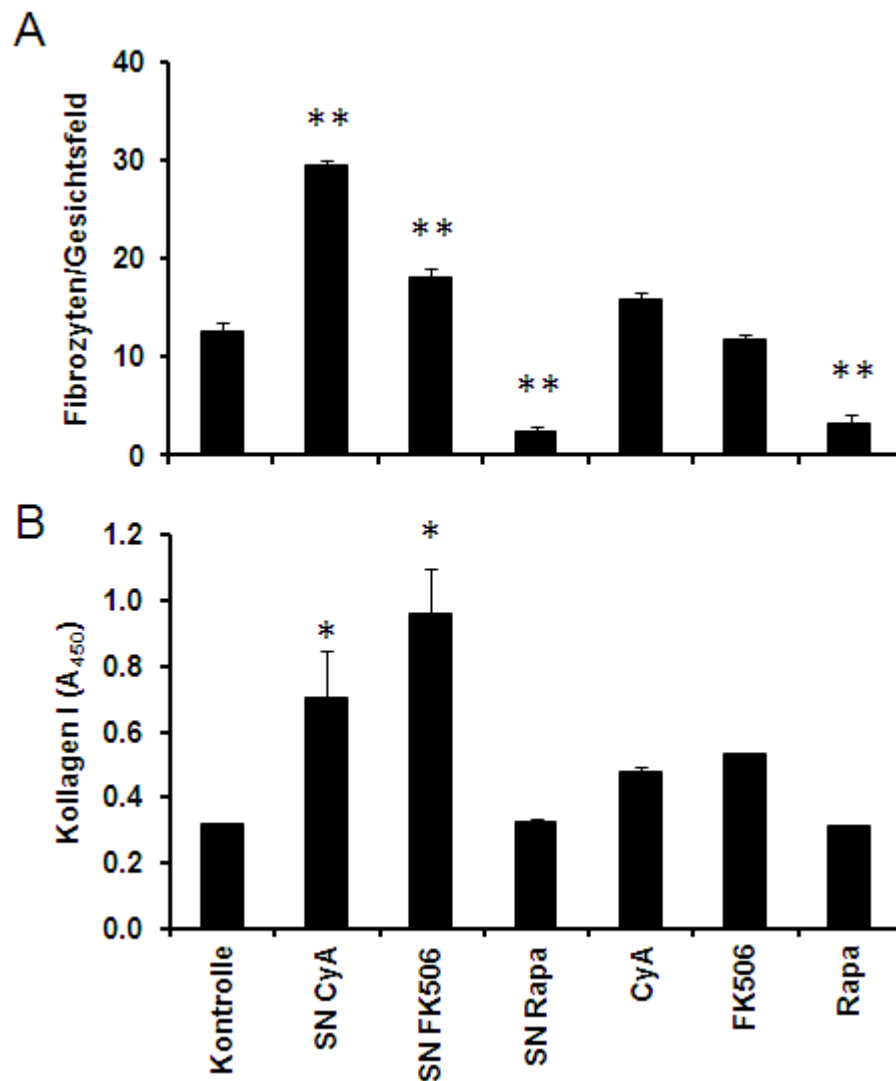


Abb. 14: Einfluss von Immunsuppressiva auf die Differenzierung von Fibrozyten. CD11b⁺ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium (Kontrolle), SN CyA (80%), SN FK506 (80%), SN Rapamycin (SN Rapa; 80%) oder direkt mit Cyclosporin A (CyA; 2 µg/ml), FK506 (250 ng/ml) oder Rapamycin (Rapa; 40 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt (A) und die Menge an sezerniertem Kollagen I in der Zellkulturplatte mittels ELISA gemessen (B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung bzw. Mittelwerte ± SEM von Triplikaten eines Zellkulturansatzes. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrolle ermittelt. p<0,05 (*), p<0,01 (**)

Die entwicklungssteigernde Wirkung des SN CyA auf die Differenzierung von Fibrozyten aus Monozyten konnte durch eine Erhitzung des Überstandes auf 95°C für 10 min verhindert werden. Die Zahl der spindelförmigen Zellen, die im Durchlichtmikroskop pro

Gesichtsfeld ausgezählt wurden, zeigte mit 5,3 Zellen unter Kontrollbedingungen und 4,2 Zellen in der Kultur mit erhitztem SN CyA das gleiche Niveau. Mit unbehandeltem SN CyA konnte dagegen die Zahl der spindelförmigen Zellen auf annähernd das Doppelte mit 9,5 Zellen/Gesichtsfeld gesteigert werden. Dies spricht dafür, dass hitzeinstabile Faktoren im SN CyA, die sich vermutlich aus löslichen Proteinen zusammensetzen, die Entwicklung von Fibrozyten beeinflussen (Abb. 15).

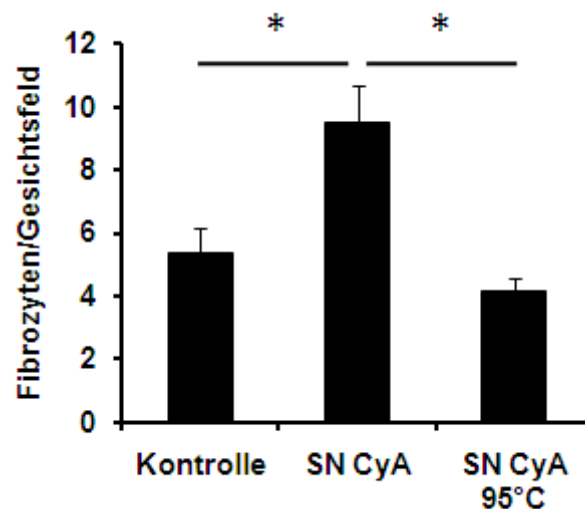


Abb. 15: Hitzeinstabile Faktoren im SN CyA beeinflussen die Differenzierung von Fibrozyten. CD11b⁺ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium (Kontrolle), SN CyA (80%) oder erhitztem SN CyA (10 min, 95°C; 80%) kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zu den Werten der Kontrolle bzw. von SN CyA bestimmt. $p < 0,05$ (*)

TGF- β schien als möglicher Kandidat zu diesen Faktoren zu zählen, da Cyclosporin A die Expression von TGF- β in T-Zellen induzieren kann (83;84) und TGF- β bekanntermaßen die Entwicklung von Fibrozyten fördern kann (16;19). Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurde die Wirkung von TGF- β im Überstand durch einen blockierenden Antikörper neutralisiert. Hierfür wurde der SN CyA für eine Stunde mit 20 μ g/ml des neutralisierenden Antikörpers gegen TGF- β bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend für die Kultur mit CD11b⁺ Monozyten eingesetzt. Die Blockade von TGF- β im SN CyA führte zu einer verringerten Entwicklung von Monozyten in Fibrozyten im Vergleich zu unbehandeltem SN CyA. Die im Durchlichtmikroskop gezählte Zahl der spindelförmigen Zellen verminderte sich um ein Drittel von 17,2 Zellen/Gesichtsfeld auf 11 Zellen/Gesichtsfeld unter der Blockade von TGF- β im SN CyA. Der Antikörper gegen

TGF- β nahm dagegen keinen deutlichen Einfluss auf die Differenzierung der Fibrozyten ohne SN CyA (Abb. 16). Dies lässt den Schluss zu, dass TGF- β an der steigenden Wirkung des SN CyA beteiligt ist.

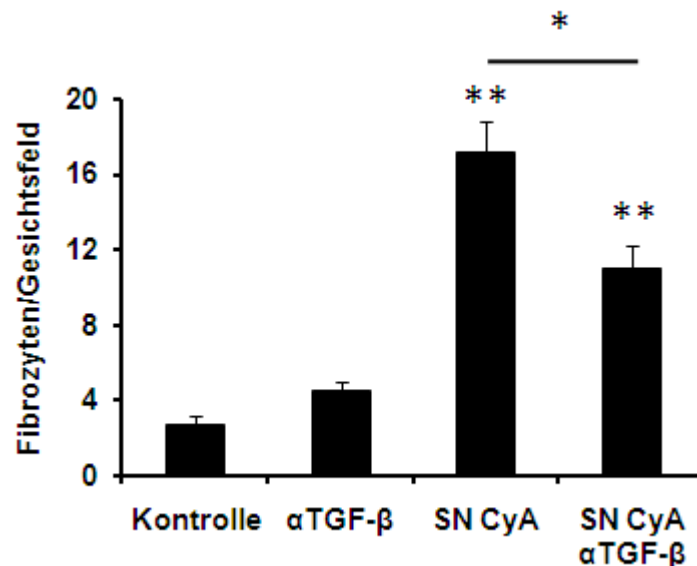


Abb. 16: Einfluss von TGF- β im SN CyA auf die Differenzierung von Fibrozyten. CD11b⁺ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium (Kontrolle), einem neutralisierenden Antikörper gegen TGF- β (α TGF- β ; 20 μ g/ml), SN CyA (80%) oder SN CyA, der für 1 h mit 20 μ g/ml α TGF- β vorinkubiert wurde (SN CyA α TGF- β ; 80%) kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zu den Werten der Kontrolle bzw. von SN CyA bestimmt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

3.3 Gesteigerte Entwicklung von Fibrozyten durch Gadolinium

Fibrozyten werden in letzter Zeit häufig im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der nephrogenen systemischen Fibrose (NSF) erwähnt. Die NSF tritt vor allem in Patienten mit stark eingeschränkter Nierenfunktion auf und ist charakterisiert durch das Auftreten von Hautveränderungen, die u. a. mit Verhärtungen und Knötchenbildung einhergehen, sowie fibrotischen Veränderungen in zahlreichen Organen. In Hautbiopsien von NSF-Patienten wurden in histologischen Untersuchungen zahlreiche spindelförmige CD34⁺ Fibrozyten nachgewiesen. Eine mögliche Ursache für die NSF scheint der Einsatz von gadolinium-haltigen Kontrastmitteln zu sein (85;86). Aus diesem Grund wurde die „seltene Erde“ Gadolinium Gd³⁺ auf ihren Einfluss auf die Entwicklung von Fibrozyten aus ihren monozytären Vorläuferzellen hin untersucht. Freies Gadolinium kann nämlich von Monozyten und Makrophagen aufgenommen werden. Aufgereinigte Monozyten wurden hierzu mit verschiedenen Konzentrationen von Gd³⁺ inkubiert. Zur Kontrolle wurden

CD11b⁺ Monozyten in reinem Medium mitgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Konzentration von 10 μM Gd³⁺ zu einer deutlichen Erhöhung der Zahl an spindelförmigen Fibrozyten im Vergleich zur mit Medium kultivierten Kontrolle führte. Die Zahl der spindelförmigen Zellen stieg um das beinahe 2,5-fache von 10 Zellen/Gesichtsfeld unter Kontrollbedingungen auf 23,4 Zellen/Gesichtsfeld nach Zugabe von 10 μM Gd³⁺ an (Abb. 17 A). Dies bestätigte sich auch in der vermehrten Ablagerung von Kollagen I in der Kulturplatte nach Kultivierung mit Gadolinium. Die Quantifizierung im ELISA zeigte dabei eine Erhöhung der Absorptionswerte um ein Drittel unter Zugabe von 10 μM Gadolinium im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abb. 17 B).

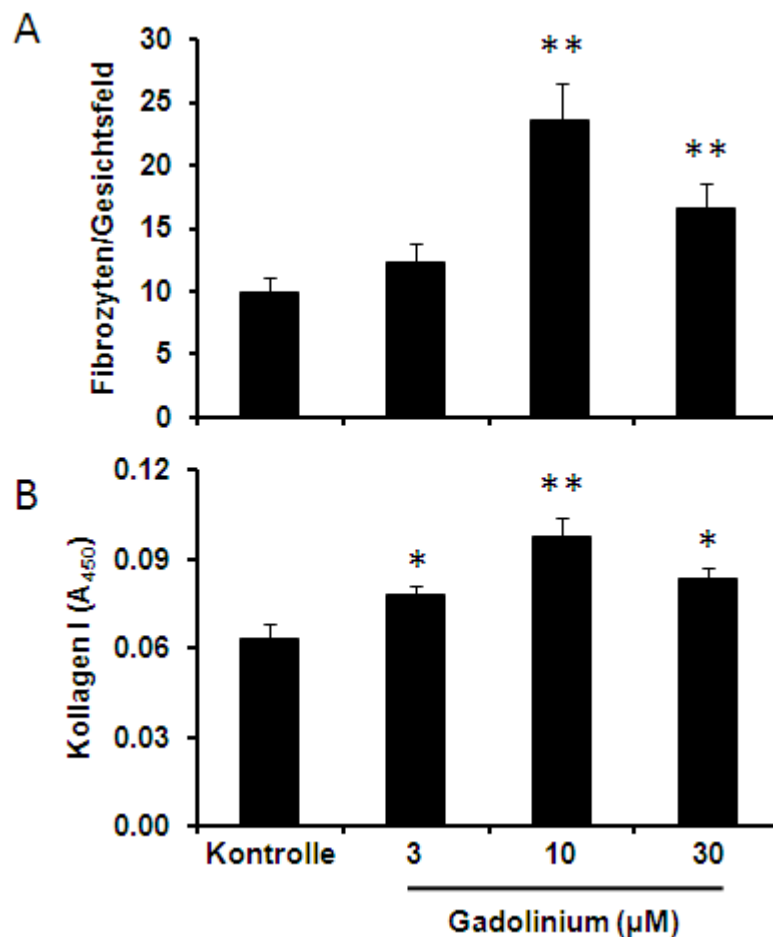


Abb. 17: Verstärkte Entwicklung von Monozyten in Fibrozyten nach Stimulation mit Gadolinium. Isolierte CD11b⁺ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium (Kontrolle) oder Gadolinium (Gd³⁺) in den Konzentrationen 3, 10 und 30 μM kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt (A) und die Menge an sezerniertem Kollagen I in der Kulturplatte mittels ELISA gemessen (B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung bzw. als Mittelwerte \pm SEM von Triplikaten eines Zellkulturansatzes. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrolle bestimmt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

Des Weiteren wurde das gadolinium-haltige MR-Kontrastmittel Magnevist® auf seinen Einfluss auf die Entwicklung von Fibrozyten hin in einer Kultur von CD11b⁺ Zellen untersucht. In einer Verdünnung von 1:1000 mit frischem Medium steigerte es ebenfalls deutlich das Auftreten von Fibrozyten und die Ablagerung von Kollagen I in der Kulturplatte. Die Zahl der spindelförmigen Zellen konnte ähnlich reinem Gadolinium um das 2,5-fache von 4 Zellen/Gesichtsfeld in der Kultur ohne Magnevist® auf 10,4 Zellen/Gesichtsfeld in der Kultur mit Magnevist® in einer Verdünnung von 1:1000 mit Medium gesteigert werden (Abb. 18 A). Die Quantifizierung im ELISA zeigte eine Erhöhung der Absorptionswerte um das Doppelte unter der Zugabe von Magnevist® (1:1000 mit Medium) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 18 B).

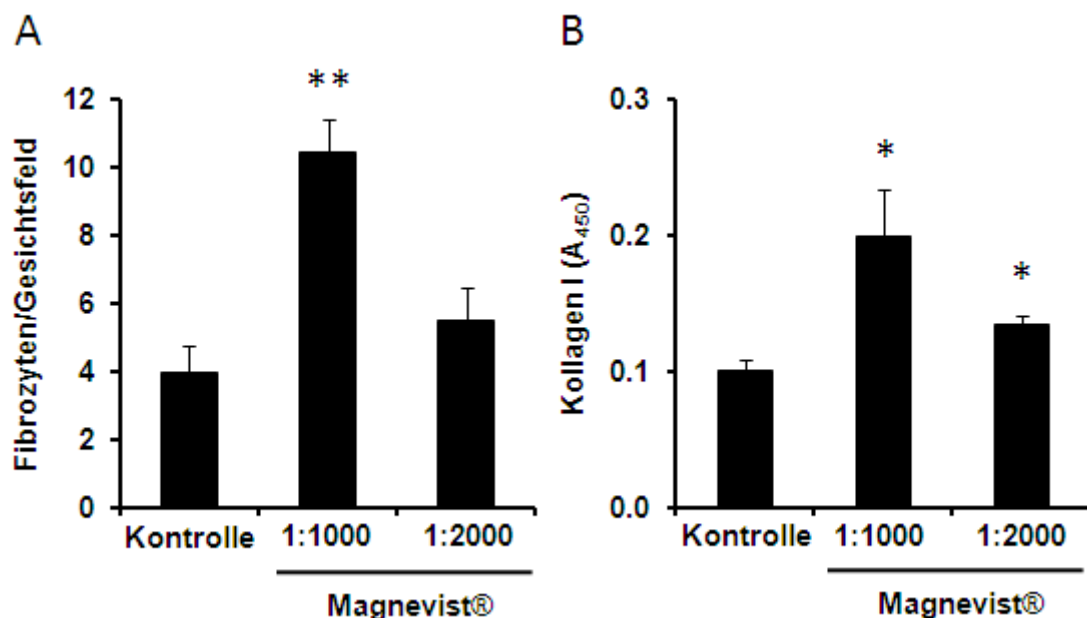


Abb. 18: Verstärkte Entwicklung von Monozyten in Fibrozyten nach Stimulation mit dem Gd³⁺-haltigen Kontrastmittel Magnevist®. Isolierte CD11b⁺ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium (Kontrolle) oder dem Kontrastmittel Magnevist® in den Verdünnungen 1:1000 oder 1:2000 mit Medium kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt (A) und die Menge an sezerniertem Kollagen I in der Kulturplatte mittels ELISA gemessen (B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung bzw. als Mittelwerte ± SEM von Triplikaten eines Zellkulturansatzes. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrolle bestimmt. p<0,05 (*), p<0,01 (**)

3.4 Der Einfluss von T-Zell-Zytokinen auf die Entwicklung von Fibrozyten

Um die Einflussnahme von T-Zell-produzierten Faktoren auf die Differenzierung von monozytären Vorläuferzellen in reife Fibrozyten näher zu bestimmen, wurden weitere

Versuche mit den Überständen von polyklonal aktivierten $CD4^+$ T-Zellen unternommen. Wie bereits vorher beschrieben, führte die polyklonale Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen in der Anwesenheit von Calcineurin-Inhibitoren zu einer Freisetzung löslicher Faktoren, die die Differenzierung von Fibrozyten erhöhten. Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, dass der Überstand von $CD4^+$ T-Zellen (SN), die in Abwesenheit von Immunsuppressiva polyklonal aktiviert wurden, die Entwicklung von spindelförmigen Fibrozyten aus ihren monozytären Vorläufern vollständig verhinderte. Sichtbar wurde dies im Durchlichtmikroskop in der Auszählung der spindelförmigen Zellen pro Gesichtsfeld. Unter Kontrollbedingungen, das heißt in der Kultur von $CD11b^+$ Monozyten mit reinem Medium, konnten nach 14 Tagen 16,1 spindelförmige Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt werden, wohingegen in der Kultur mit SN keine spindelförmigen Zellen ausgewachsen waren. Im Gegensatz dazu wurden in der Kultur mit SN CyA als Positivkontrolle 38,7 Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt (Abb. 19).

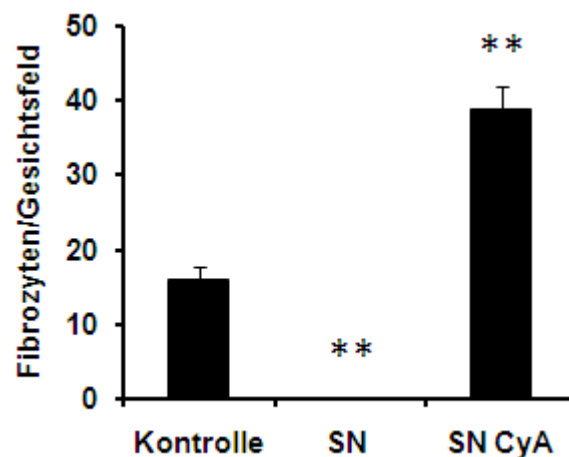


Abb. 19: Einfluss von Überständen von in An- und Abwesenheit von Cyclosporin A aktivierter $CD4^+$ T-Zellen auf die Differenzierung von Fibrozyten. Isolierte $CD11b^+$ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium (Kontrolle), dem Überstand von $CD4^+$ T-Zellen, die in Abwesenheit (SN; 80%) oder in Anwesenheit von Cyclosporin A (SN CyA; 80%) aktiviert wurden, kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrolle ermittelt. $p < 0,01$ (**)

Dieses Ergebnis bestätigte sich in der durchflusszytometrischen Messung der geernteten Zellen. Die für Fibrozyten typische Zellpopulation im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) fehlte in der Kultur mit SN und es waren keine Kollagen I⁺ Zellen nachweisbar (Abb. 20 A, B).

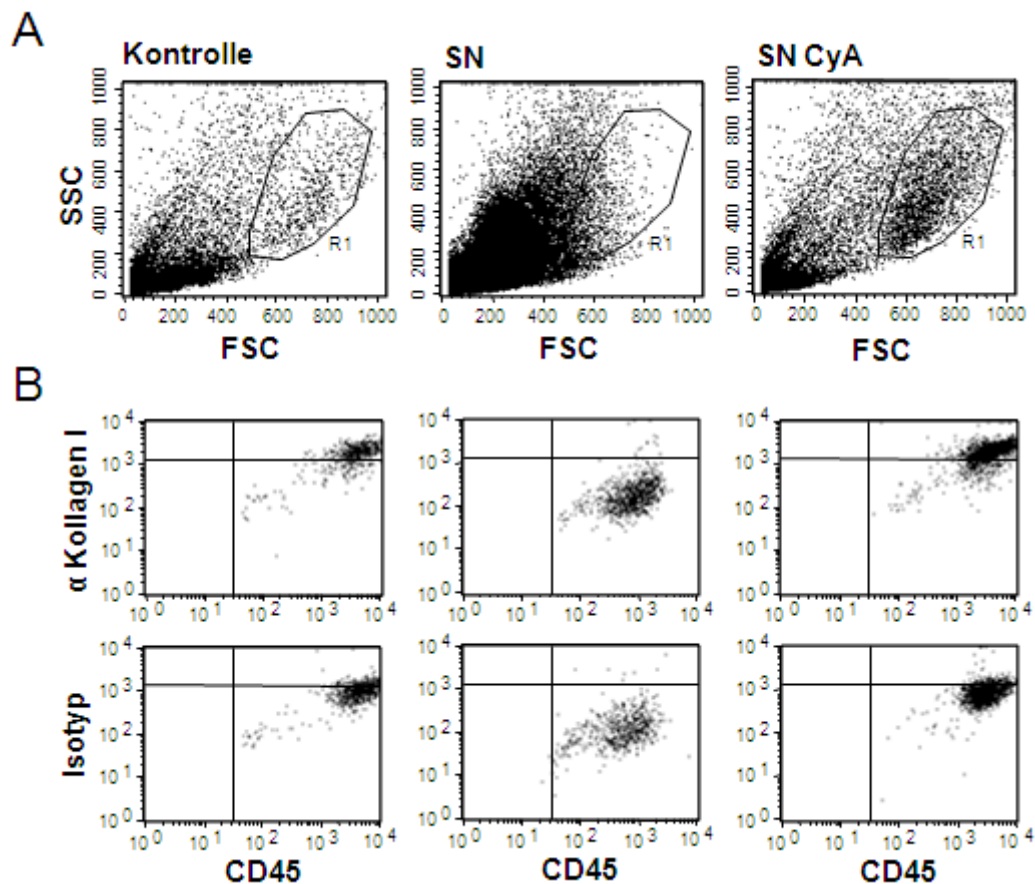
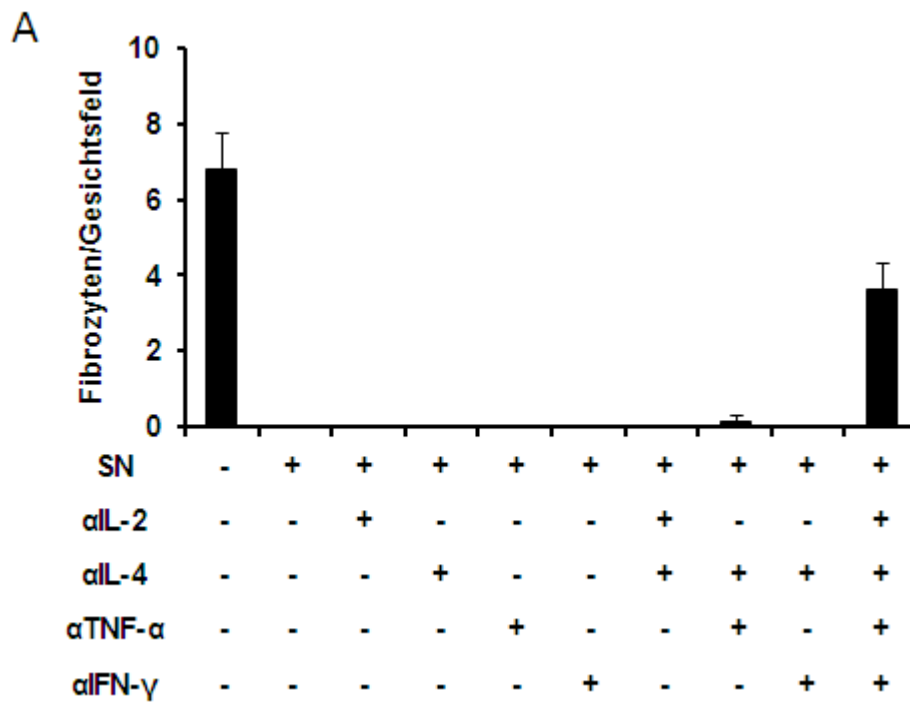


Abb. 20: FACS-Analyse von Fibrozyten nach Stimulation mit SN oder SN CyA. Isolierte CD11b⁺ Monozyten wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Kulturloch für 14 Tage mit Medium (Kontrolle), dem Überstand von CD4⁺ T-Zellen, die in Abwesenheit (SN; 80%) oder in Anwesenheit von Cyclosporin A (SN CyA; 80%) aktiviert wurden, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf ihre Eigenschaften im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) untersucht (A). Die Zellen wurden extrazellulär auf die Expression von CD45 und intrazellulär auf die Expression von Kollagen I im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle analysiert (B).

Um die auf die Fibrozytenentwicklung suppressiv wirkenden Faktoren in diesem Überstand näher zu untersuchen, wurden blockierende Antikörper gegen verschiedene T-Zell-sekretierte Zytokine eingesetzt. Diese sollten die Wirkung der Zytokine im Überstand neutralisieren. Hierfür wurden die Überstände eine Stunde bei RT mit 20 μ g/ml der blockierenden Antikörpern inkubiert, bevor sie in die Zellkultur mit isolierten CD11b⁺ Monozyten eingesetzt wurden. Dabei zeigte sich, dass die kombinierte Blockade von vier Zytokinen, nämlich IL-2, IL-4, TNF- α und IFN- γ erforderlich war, um die Entwicklung der spindelförmigen Fibrozyten wiederherzustellen. Wurden die Antikörper dagegen einzeln im Überstand der aktivierten T-Zellen eingesetzt, konnte dessen suppressive Wirkung nicht aufgehoben werden und es differenzierten sich keine Fibrozyten aus (Abb. 21 A). Die Blockade von zwei oder drei dieser Faktoren hatte keinen oder nur mäßigen Effekt.

Auch die zusätzliche Zugabe von einem Antikörper gegen IL-21 zeigte keinerlei weitere Wirkung auf die Differenzierung der Fibrozyten (Abb. 21 B). Dies zeigte auch die durchflusszytometrische Messung. Es konnten keine Kollagen I⁺ Zellen nachgewiesen werden.



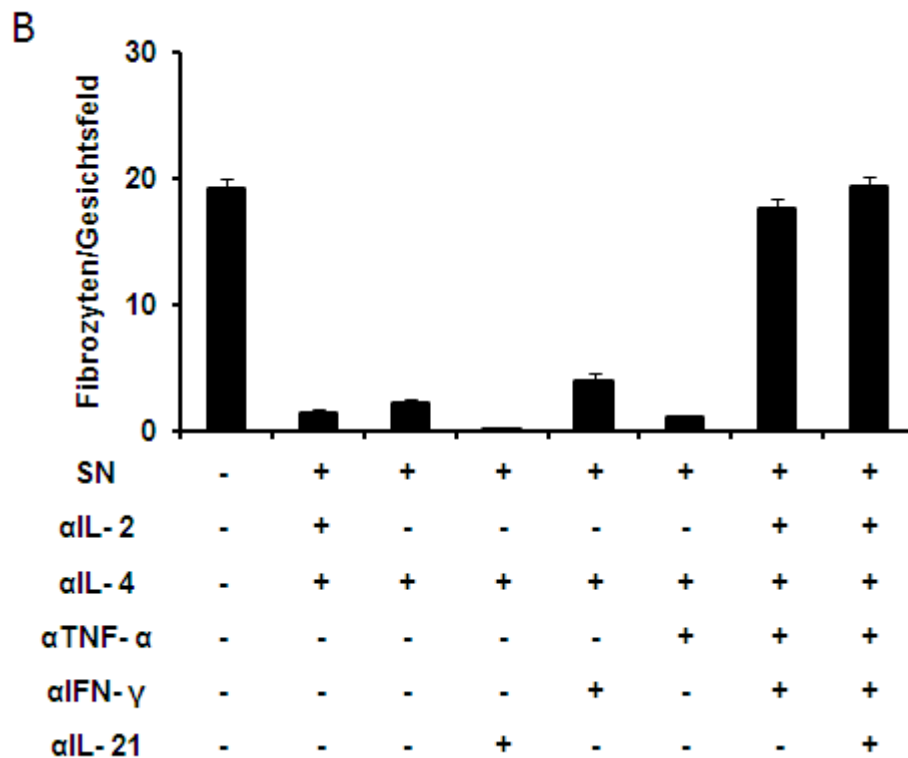


Abb. 21: Der Einfluss verschiedener T-Zell-produzierter Zytokine im SN auf die Differenzierung von Fibrozyten. CD11b⁺ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium, dem Überstand polyklonal aktivierter CD4⁺ T-Zellen (SN; 80%) oder SN, der für 1 h mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-2 (αIL-2; 20 µg/ml), IL-4 (αIL-4; 20 µg/ml), TNF-α (αTNF-α; 20 µg/ml), INF-γ (αIFN-γ; 20 µg/ml) und IL-21 (αIL-21; 20 µg/ml) vorinkubiert wurde, kultiviert. Die Antikörper wurden dabei einzeln (A) oder in verschiedenen Kombinationen (A, B) eingesetzt. Anschließend wurden die spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung.

Zur genaueren Aufklärung der suppressiven Effekte dieser Zytokine wurden weitere Versuche mit einer Reihe von rekombinanten Zytokinen unternommen. Diese wurden direkt in einer Konzentration von 10 ng/ml in der Kultur mit aufgereinigten CD11b⁺ Monozyten eingesetzt und nach 14 Tagen die Zahl der sich daraus entwickelten, spindelförmigen Fibrozyten im Durchlichtmikroskop bestimmt. Die Anwendung von einzelnen Zytokinen zeigte, dass IFN-γ, IL-2 und TNF-α suppressive Wirkung auf die Entstehung spindelförmiger Fibrozyten haben (Abb. 22 A). Die Zugabe von IL-2 zur Kultur der CD11b⁺ Monozyten senkte die Zahl der spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld von 15,2 in der Mediumkontrolle auf 5,9 Zellen unter stimulierten Bedingungen. TNF-α bewirkte eine Verminderung auf 9,6 Zellen/Gesichtsfeld und INF-γ auf 3,8 Zellen/Gesichtsfeld. Der gleichzeitige Einsatz von IL-2 und TNF-α, IL-2 und IL-4 oder IL-2 und IFN-γ zeigte eine noch stärkere Hemmung der Fibrozytendifferenzierung, die auch deutlich die Ablagerung von Kollagen I in der Kulturplatte verringerte (Abb. 22 A, B). So konnten nach der Zugabe

von IL-2 und TNF- α nur noch 0,2 Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt werden. Die gleichzeitige Gabe von IL-2 und IL-4 bewirkte einen Rückgang der Fibrozytenzahl auf 1,3 Zellen/Gesichtsfeld und von IL-2 und IFN- γ auf 2,6 Zellen/Gesichtsfeld. Die Quantifizierung von sezerniertem Kollagen I in der Kulturplatte zeigte eine um die Hälfte verminderte Produktion von Kollagen I nach der gleichzeitigen Zugabe von IL-2 und IL-4 und IL-2 und IFN- γ . IL-2 und TNF- α verringerten die Kollagen I-Produktion sogar um das 2,5-fache (Abb. 22 B). IL-13 fördert bekannterweise beim Menschen die Entwicklung von Fibrozyten (26), dies konnte in einer vermehrten Kollagen I-Produktion für die Maus bestätigt werden. Die Absorptionswerte im Kollagen I-ELISA stiegen nach der Zugabe von IL-13 um ein Drittel an (Abb. 22 B).

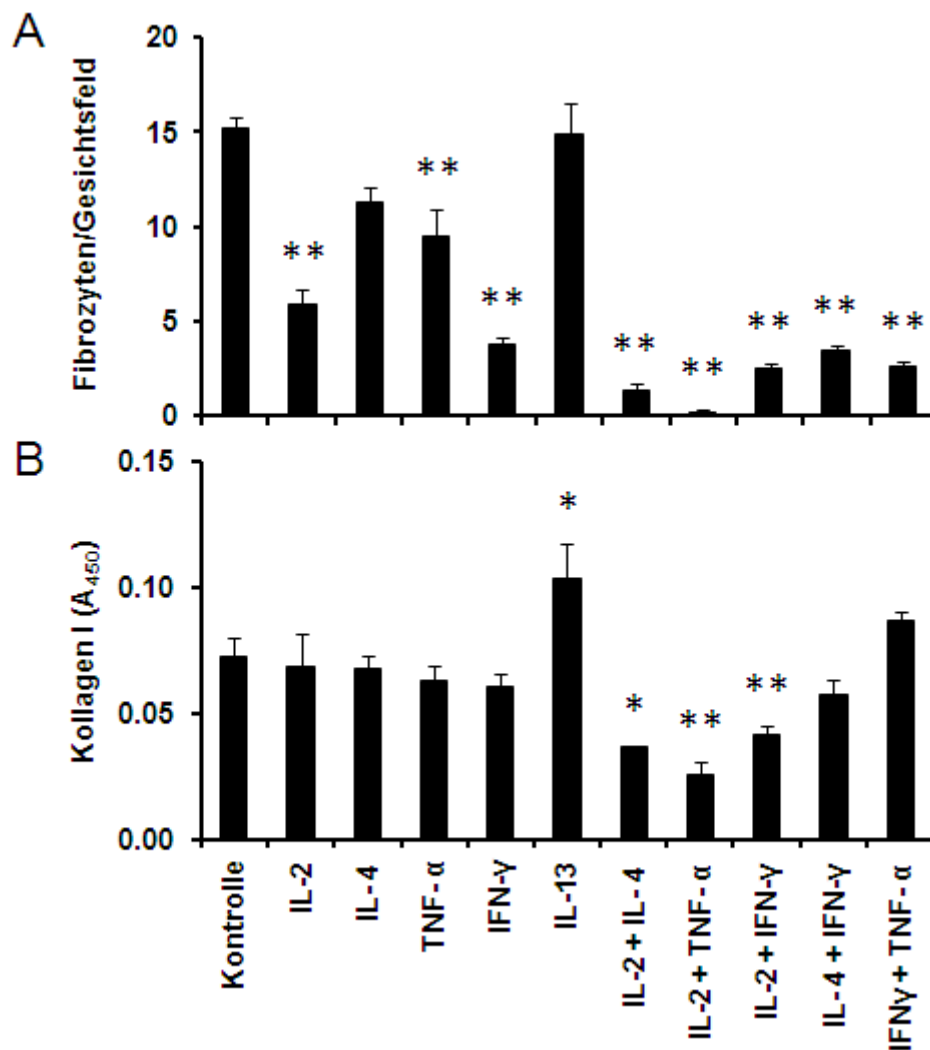


Abb. 22: Der Einfluss verschiedener rekombinanter Zytokine auf die Differenzierung von Fibrozyten. CD11b⁺ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium (Kontrolle) oder IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ und IL-13 (jeweils in einer Konzentration von 10 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurden die spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt (A) und die Menge an sezerniertem Kollagen I in der Zellkulturplatte mittels ELISA gemessen (B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung bzw. als Mittelwerte \pm SEM von Triplikaten eines Zellkulturansatzes. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrolle bestimmt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

Des Weiteren verhinderten alle getesteten Kombinationsmöglichkeiten aus drei dieser Zytokine beinahe vollkommen die Entwicklung von spindelförmigen Fibrozyten (Abb. 23 A). Eine Quantifizierung von Kollagen I in der Kulturplatte mit Hilfe eines Kollagen I-ELISA bestätigte dieses Ergebnis, da kein Kollagen I gemessen werden konnte (Abb. 23 B).

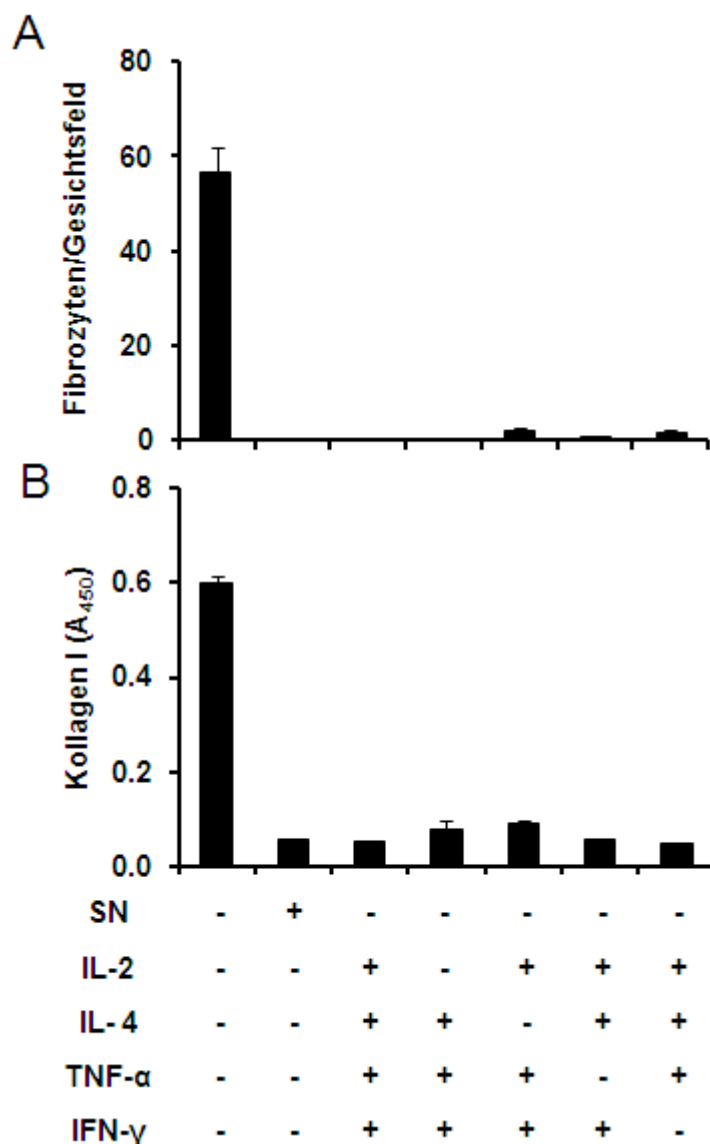


Abb. 23: Der Einfluss verschiedener rekombinanter Zytokine in Kombination auf die Differenzierung von Fibrozyten. CD11b⁺ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium (Kontrolle), SN (80%) oder mit Kombinationen aus IL-2, IL-4, TNF- α und IFN- γ (jeweils in einer Konzentration von 10 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurden die spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt (A) und die Menge an sezerniertem Kollagen I in der Zellkulturplatte mittels ELISA gemessen (B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung bzw. als Mittelwerte \pm SEM von Triplikaten eines Zellkulturansatzes. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrolle bestimmt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

Um das Potential der suppressiven Wirkung von T-Zell-produzierten Zytokinen näher zu analysieren, wurde die Kombination von IL-2 und TNF- α gleichzeitig mit SN CyA oder Gadolinium in die Kultur von isolierten CD11b⁺ Monozyten eingesetzt. Wie bereits gezeigt werden konnte, zeigten der Überstand von in Gegenwart von Cyclosporin A aktivierten CD4⁺ T-Zellen und Gadolinium in einer Konzentration von 10 μ M eine starke stimulatorische Wirkung auf die Differenzierung von Fibrozyten aus ihren monozytären Vorläufern. Es zeigte sich, dass eine gleichzeitige Gabe von IL-2 und TNF- α die Ausbildung von Fibrozyten auch in Anwesenheit von wirkungsvollen Aktivatoren der Fibrozytenentwicklung wie SN CyA oder Gadolinium nahezu vollständig verhinderte und sich keine spindelförmigen Zellen ausbildeten (Abb. 24).

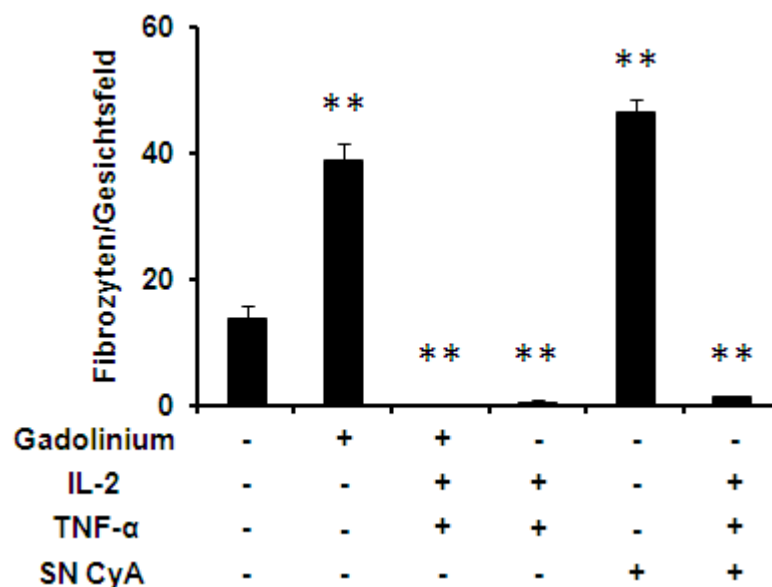


Abb. 24: Die suppressive Wirkung von IL-2 und TNF- α auf die Differenzierung von Fibrozyten. CD11b⁺ Monozyten wurden für 14 Tage mit Medium (Kontrolle), 10 μ M Gadolinium und SN CyA (80%) alleine oder in Kombination mit IL-2 und TNF- α kultiviert. Anschließend wurden die spindelförmigen Zellen/Gesichtsfeld ausgezählt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 3 Gesichtsfeldern von 3 Wells/Bedingung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrolle bestimmt. $p < 0,01$ (**)

Fasst man diese Erkenntnisse zusammen, supprimiert die Kombination von IL-2 und TNF- α äußerst wirksam die Entwicklung von Fibrozyten aus deren monozytären Vorläuferzellen.

3.5 IL-2 und TNF- α vermindern die Zahl der Fibrozyten und den Umfang einer Nierenfibrose *in vivo*

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse, die *in vitro* zur Entwicklung von Fibrozyten aus ihren monozytären Vorläuferzellen erlangt wurden, stellte sich die Frage, welchen Einfluss T-Zellen und von ihnen produzierte Faktoren auf die Differenzierung von Fibrozyten *in vivo* und deren Rolle bei Organfibrosen nehmen. Zu diesem Zweck wurde das Modell der einseitigen Ureterligatur (*unilateral ureteral obstruction*, UUO) in Mäusen etabliert. Hierbei wird durch das Abbinden eines Harnleiters in C57BL/6 Mäusen eine renale Fibrose induziert. Es entwickelt sich in der Niere infolge des Harnstaus eine Hydronephrose mit progressiver Dilatation des Nierenbeckens und Schwund des Nierenparenchyms. Weiterhin kommt es zu einer Einlagerung von extrazellulären Matrixkomponenten im Nierenkortex und einer vermehrten Ansammlung kollagen I-produzierender Zellen in der Niere (87-89). Am Tag 7 nach der Krankheitsinduktion wurden die fibrotische Niere (UUO Niere), die gegenseitige Niere als interne Kontrolle (Kontrollniere) und die Milz entnommen und auf infiltrierende Fibrozyten hin untersucht. Hierfür wurde durch einen Verdau mit Kollagenase Typ I eine Einzelzellsuspension hergestellt, die im Durchflusszytometer untersucht wurde. Für die Identifizierung der Fibrozyten wurden die gesamten Nierenzellen mit Antikörpern gegen CD45, CD11b und Kollagen I gefärbt. Die Färbung mit einem Isotyp-Kontrollantikörper bestätigte die Spezifität der intrazellulären Färbung für Kollagen I (Abb. 25 A). Auf diese Weise konnten in den UUO Nieren deutlich mehr CD45⁺, Kollagen I⁺ Zellen als in der gegenseitigen Niere oder der Milz nachgewiesen werden. Die CD11b⁺, CD45⁺, Kollagen I⁺ Zellen wurden hierbei als Prozent der gesamten CD45⁺ infiltrierenden Zellen dargestellt (Abb. 25 B).

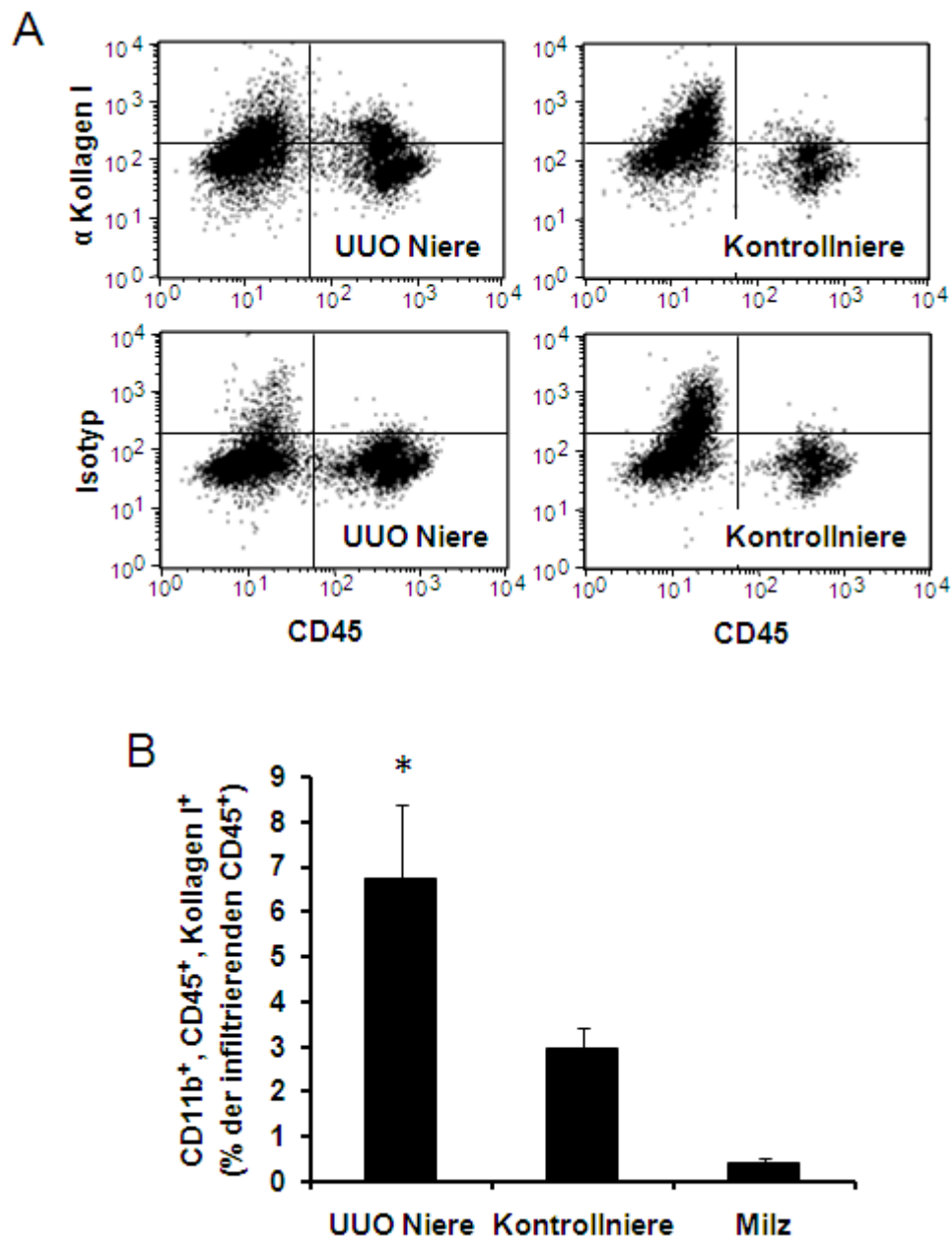


Abb. 25: Nachweis von Fibrozyten in der fibrotischen Niere im Modell der einseitigen Ureterligatur mittels FACS-Analyse. Am Tag 7 nach Induktion einer einseitigen Ureterligatur in C57BL/6 Mäusen wurden Einzelzellsuspensionen der ligierten Niere (UUO Niere), der gegenseitigen Kontrollniere und der Milz durch Antikörperfärbung auf die Expression von CD45 und CD11b auf der Oberfläche und intrazellulär auf die Expression von Kollagen I im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle im Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots von CD45⁺ und Kollagen I⁺ Fibrozyten in der UUO- und Kontrollniere (A) und die Zahl der CD45⁺, CD11b⁺, Kollagen I⁺ Fibrozyten als Prozent aller infiltrierenden CD45⁺ Zellen in der UUO Niere, der Kontrollniere und der Milz (B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 5 Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollniere bestimmt. $p < 0,05$ (*)

In der fibrotischen UUO Niere bildeten die Fibrozyten 6,72 % aller infiltrierender CD45⁺ Zellen, wohingegen die Fibrozyten nur 2,95 % in der gegenseitigen Kontrollniere und 0,41

% in der Milz der gesamten $CD45^+$ Zellen ausmachten. Die Population der Fibrozyten stellte in der UUO Niere 0,5 % der gesamten Zellen und in der Kontrollniere 0,05 % der gesamten Zellen, die in der Durchflusszytometrie detektiert wurden.

Infolge der weitläufigen Verteilung von Kollagen I in der UUO Niere war es nicht möglich, deutlich doppelpositive $CD45^+$, Kollagen I⁺ Zellen mittels Immunhistologie nachzuweisen. Um jedoch die Expression von Kollagen I in $CD45^+$ Zellen der Niere nachzuweisen, wurden $CD45^+$ Zellen aus UUO-, Kontrollnieren und Milzen isoliert. Hierfür wurden eine einseitige Ureterligatur an Ratten durchgeführt und diesen am Tag 10 nach der Operation die beiden Nieren und die Milz entnommen. Anschließend wurden mit magnetischen Microbeads gegen $CD45$ die Zellen angereichert und daraufhin mit Hilfe des FACS-sortings $CD45^+$ Zellen sauber isoliert (Abb. 26).

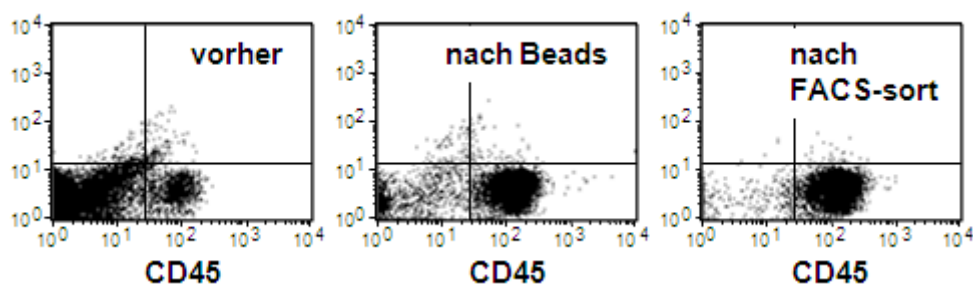


Abb. 26: Kontrolle der Aufreinigung von $CD45^+$ Zellen aus einer UUO Niere von Ratten. Am Tag 10 nach Induktion einer UUO bei Lewis-Ratten ($n=4$) wurden aus Einzelzellsuspensionen von ligierten Nieren (UUO Nieren), gegenseitigen Kontrollnieren und Milzen $CD45^+$ Zellen isoliert. Die Aufreinigung wurde durch Färbung von $CD45$ auf der Oberfläche vor der Aufreinigung (vorher), nach Anreicherung durch magnetische Microbeads (nach Beads) und nach der anschließenden Zellsortierung am FACS-sort (nach FACS-sort) durchflusszytometrisch kontrolliert. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots einer UUO-Niere.

Der Gehalt an Kollagen I-mRNA dieser so isolierten $CD45^+$ Zellen der fibrotischen UUO-Niere, der Kontrollniere und der Milz wurde mittels real-time RT-PCR quantifiziert. $CD45^+$ Zellen, die aus der abge bundenen Niere isoliert wurden, exprimierten viermal mehr Kollagen I-mRNA als $CD45^+$ Zellen der gegenseitigen Niere oder der Milz (Abb. 27). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fibrozyten in der UUO Niere vorhanden sind und eindeutig in der Durchflusszytometrie nachweisbar sind.

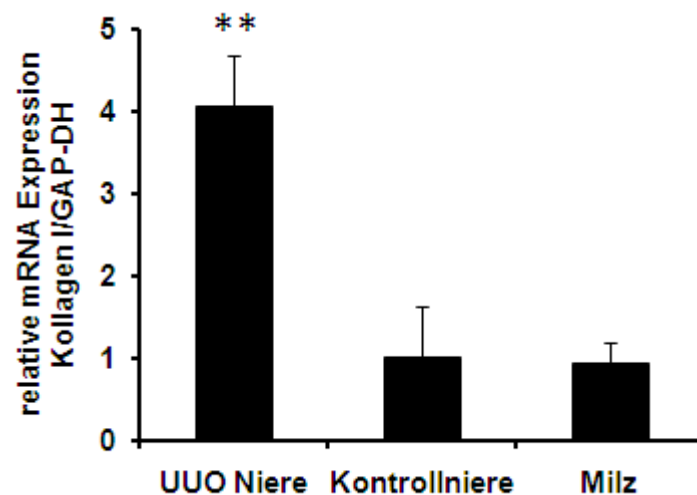


Abb. 27: Expression von Kollagen I mRNA in CD45⁺ Zellen aus Rattennieren. Nach Aufreinigung von CD45⁺ Zellen aus ligierten Nieren (UUO Nieren), gegenseitigen Kontrollnieren und Milzen von Lewis-Ratten am Tag 10 nach UUO-Induktion wurde die mRNA isoliert und die Expression von Kollagen I-mRNA mittels quantitativer real-time RT-PCR gemessen. mRNA-Level wurden zu GAP-DH normalisiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 4 Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollniere ermittelt. $p < 0,01$ (**)

Nach dem eindeutigen Nachweis von Fibrozyten in einer fibrotischen Niere infolge einer UUO wurde in 8-10 Wochen alten weiblichen C57BL/6 Mäusen eine Nierenfibrose durch eine einseitige Ureterligatur induziert. Vom Tag 0 bis zum Tag 6 nach der UUO erhielten diese Tiere zweimal täglich mit einer subkutanen Injektion je 500 ng IL-2 und TNF- α (n=5) oder PBS als Kontrolle (n=5). Am Tag 7 wurden wiederum die beiden Nieren und die Milz entnommen und eine Einzelzellsuspension dieser Organe mit dem Durchflusszytometer auf infiltrierende Fibrozyten hin untersucht (Abb. 28 A). Dabei wurden in den abgebundenen Nieren von IL-2 und TNF- α behandelten Mäusen weniger CD45⁺, CD11b⁺, Kollagen I⁺ Fibrozyten detektiert als in den UUO Nieren von PBS behandelten Kontrollmäusen (Abb. 28 B). Der prozentuale Anteil an Fibrozyten an den infiltrierenden CD45⁺ Zellen reduzierte sich durch die Gabe von IL-2 und TNF- α von 7,25 % in den fibrotischen Nieren der Kontrolltiere auf 4,89 % in denen der behandelten Tiere. Die Fibrozyten stellen damit nach der Behandlung mit IL-2 und TNF- α nur noch 0,25 % gesamten Nierenzellen.

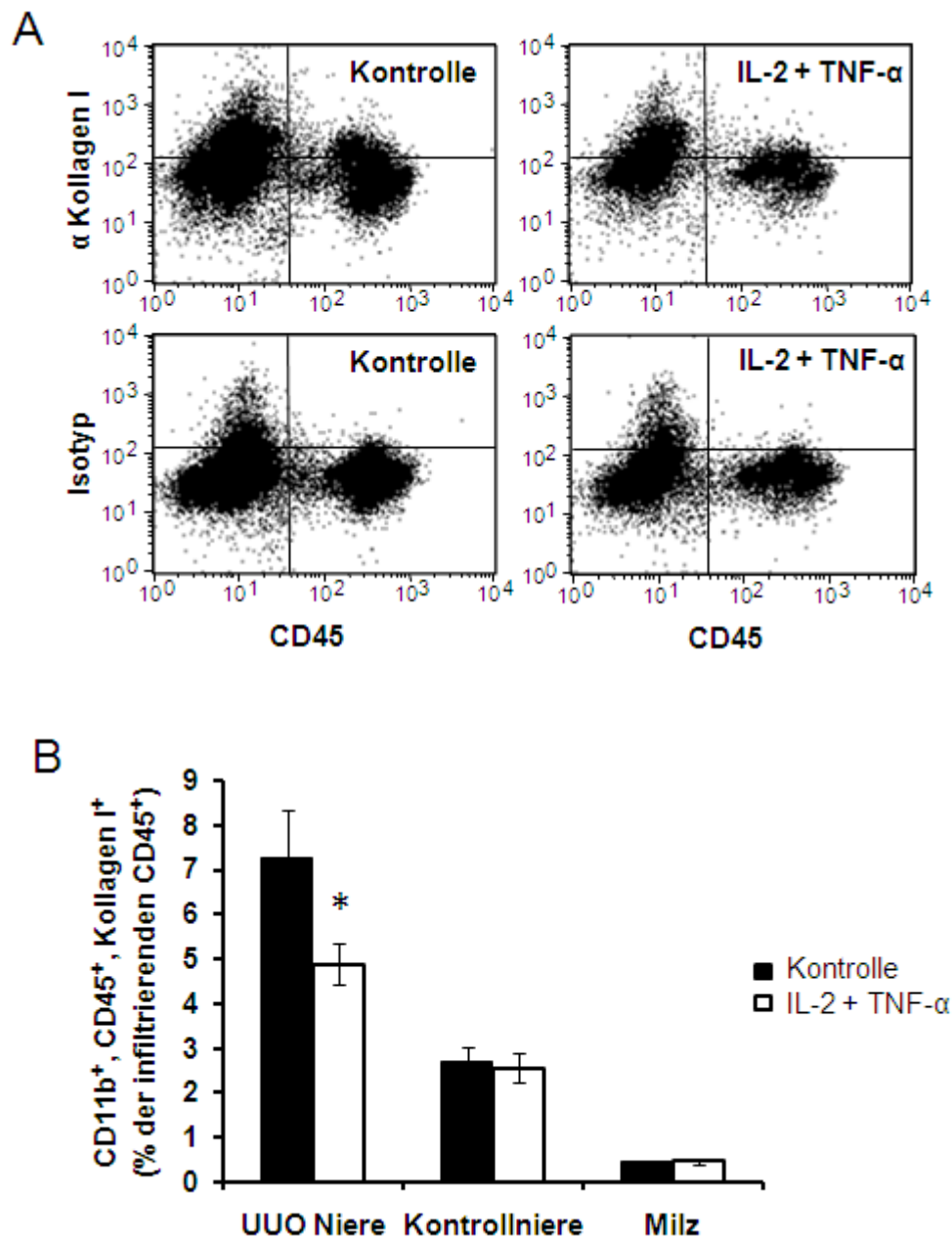


Abb. 28: Reduktion der Fibrozytenzahl in der ligierten Niere von Mäusen nach Behandlung mit IL-2 und TNF- α . C57BL/6 Mäuse wurden von Tag 0-6 nach Induktion einer Fibrose durch eine einseitige Ureterligatur mit IL-2 und TNF- α oder PBS als Kontrolle behandelt (n = 5 pro Gruppe). Am Tag 7 wurden die ligierten Nieren (UUO Nieren), die gegenseitigen Kontrollnieren und die Milzen entnommen und im Durchflusszytometer auf die Expression von CD45 und CD11b auf der Oberfläche und von Kollagen I intrazellulär untersucht. Eine intrazelluläre Färbung mit Kaninchen IgG diente als Isotyp-Kontrolle. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots von CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten in UUO Nieren der beiden Gruppen (A) und die Zahl der CD45⁺, CD11b⁺, Kollagen I⁺ Fibrozyten als Prozent aller infiltrierenden CD45⁺ Zellen in der UUO Niere, der Kontrollniere und der Milz von IL-2 + TNF- α behandelten UUO-Mäusen (weiße Balken) und PBS-Kontrolltieren (schwarze Balken; B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 5 Tieren und repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollgruppe bestimmt. $p < 0,05$ (*)

Weiterhin wurde die Expression von Kollagen I-mRNA mit real-time RT-PCR quantifiziert. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus den beiden Nieren und der Milz beider Gruppen isoliert und in cDNA umgeschrieben. In den UUO Nieren der IL-2 und TNF- α behandelten Mäuse wurde deutlich weniger Kollagen I-mRNA exprimiert als in denen der Kontrollgruppe (Abb. 29). Der mRNA-Spiegel an Kollagen I reduzierte sich in den UUO-Nieren der behandelten Mäuse um ein Drittel im Vergleich zu den UUO-Nieren der Kontrolltieren. Dagegen wurde die Zahl der Fibrozyten oder der Kollagen I-mRNA Spiegel durch die Behandlung mit IL-2 und TNF- α in der gegenseitigen Niere und der Milz kaum beeinflusst (Abb. 28, 29).

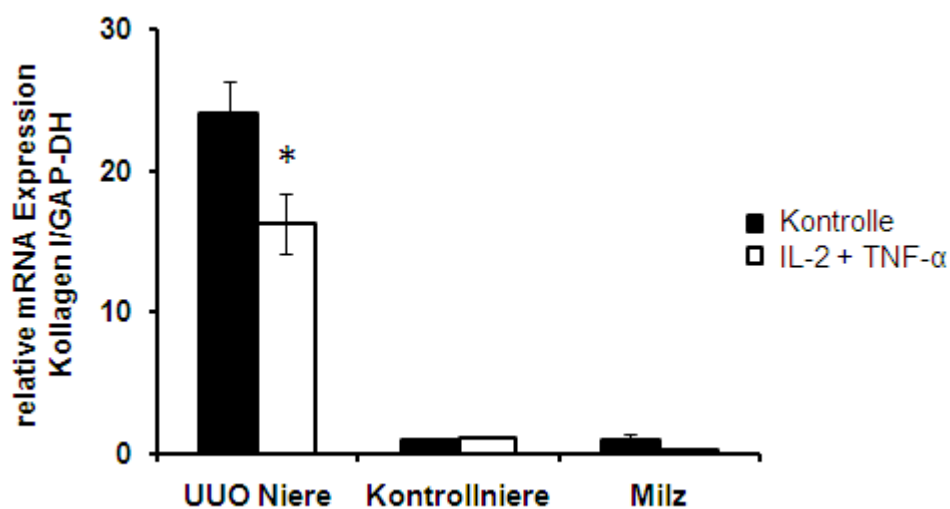


Abb. 29: Reduktion der Kollagen I mRNA-Expression in ligierten Nieren von Mäusen nach Behandlung mit IL-2 und TNF- α . C57BL/6 Mäuse wurden von Tag 0-6 nach Induktion einer Fibrose durch eine einseitige Ureterligatur mit IL-2 und TNF- α oder PBS als Kontrolle behandelt (n = 5 pro Gruppe). Am Tag 7 wurden die ligierten Nieren (UUO Nieren), die gegenseitigen Kontrollnieren und die Milzen entnommen und RNA isoliert. Die Untersuchung der Kollagen I mRNA-Expression erfolgte mittels real-time RT-PCR. mRNA-Level wurden auf GAP-DH normalisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 15 Tieren von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollgruppe bestimmt. $p < 0,05$ (*)

Des Weiteren wurden Kryoschnitte der UUO-Nieren der beiden Gruppen angefertigt und immunhistochemisch auf Kollagen I hin untersucht. Durch die Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen Kollagen I konnte die Ablagerung der extrazellulären Matrixkomponente in der fibrotischen Niere sichtbar gemacht werden (Abb. 30 A, B) und die gefärbte Fläche pro Gesichtsfeld mit Hilfe einer speziellen Software am Computer quantifiziert werden (Abb. 30 C). Die angefärbte Fläche von Kollagen I war dabei in den mit IL-2 und TNF- α behandelten Tieren deutlich verringert.

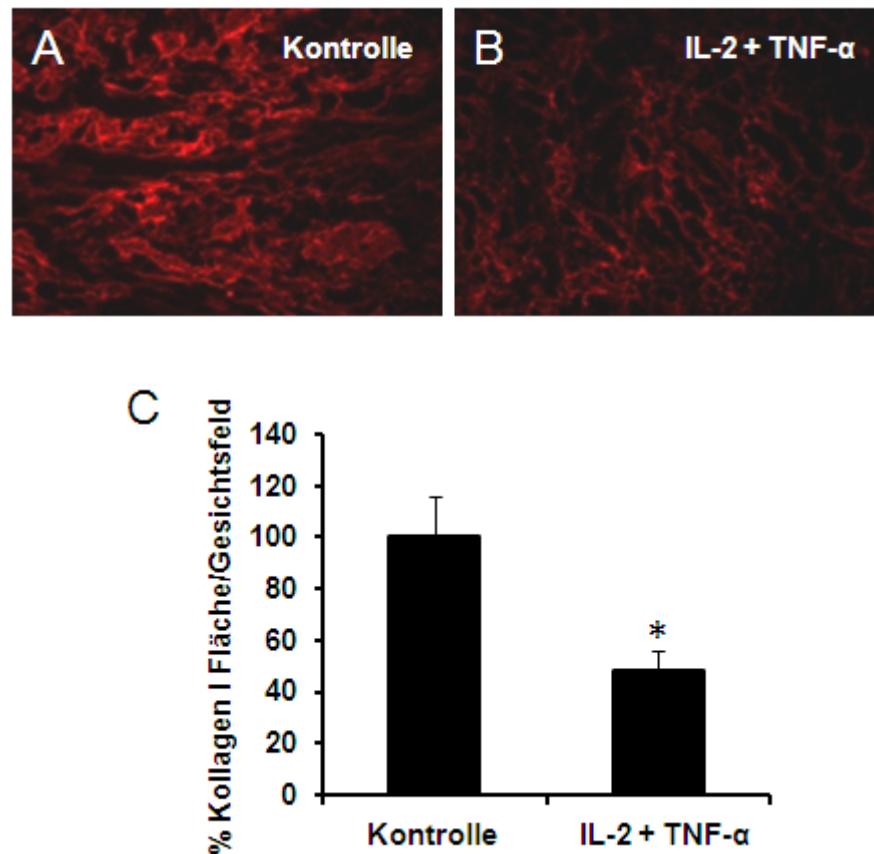


Abb. 30: Reduktion der Kollagen I-Ablagerung in ligierten Nieren von Mäusen nach Behandlung mit IL-2 und TNF- α . C57BL/6 Mäuse wurden von Tag 0-6 nach Induktion einer Fibrose durch eine einseitige Ureterligatur mit IL-2 und TNF- α oder PBS als Kontrolle behandelt (n = 5 pro Gruppe). Am Tag 7 wurden die ligierten Nieren (UUO Nieren) entnommen. Anschließend wurden Kryoschnitte der fibrotischen Nieren angefertigt und Kollagen I immunhistochemisch angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Kollagen I-gefärbten (rot) UUO Nieren von PBS-behandelten Kontrolltieren (A) und IL-2 + TNF- α behandelten Tieren (B) in einer 200-fachen Vergrößerung. Die rot gefärbte Fläche wurde quantifiziert (C). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 5 Gesichtsfeldern/Schnitt von 5 Tieren und sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollgruppe bestimmt. $p < 0,05$ (*)

Zudem wurde die Expression von Kollagen I in den UUO Nieren auf Proteinebene mittels Western-Blot überprüft. Hierfür wurden Gesamtzelllysate der fibrotischen Nieren von behandelten und Kontrolltieren verwendet. Der Nachweis wurde mit verschiedenen spezifischen Antikörpern für Kollagen I durchgeführt, wobei ein monoklonaler Antikörper von Santa Cruz am besten geeignet war. Damit konnte eine deutliche Bande für Kollagen I bei der erwarteten Molekülgröße von 70 kDa detektiert werden (Abb. 31 A). Die Quantifizierung der Kollagen I-Expression, die zur Expression des Haushaltsgens GAPDH relativiert wurde, zeigte eine verminderte Menge an Kollagen I in den UUO Nieren der

mit IL-2 und TNF- α behandelten Tieren verglichen mit den Nieren der PBS-Gruppe (Abb. 31 B).

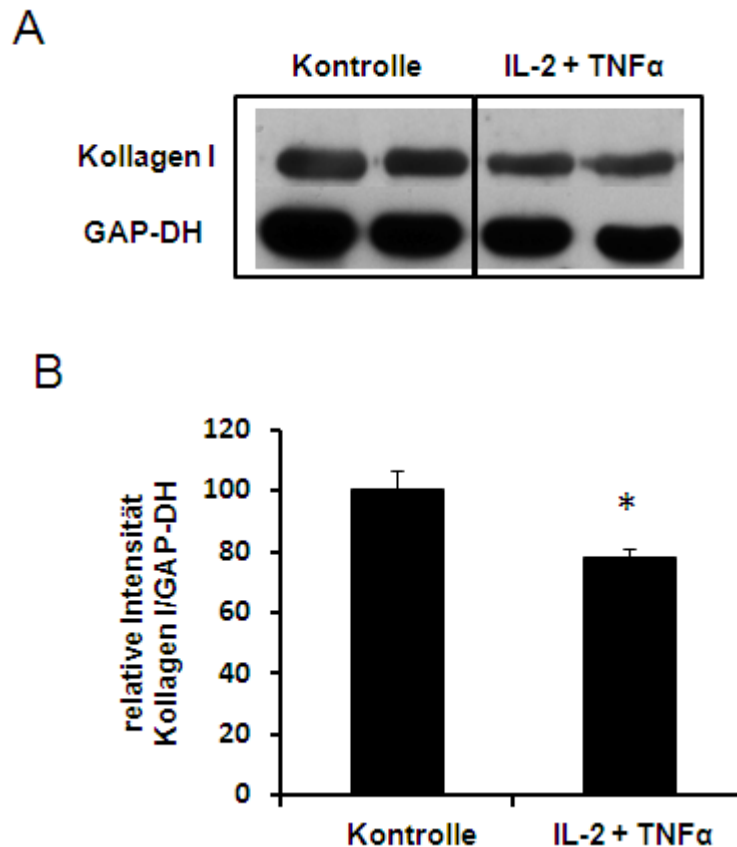
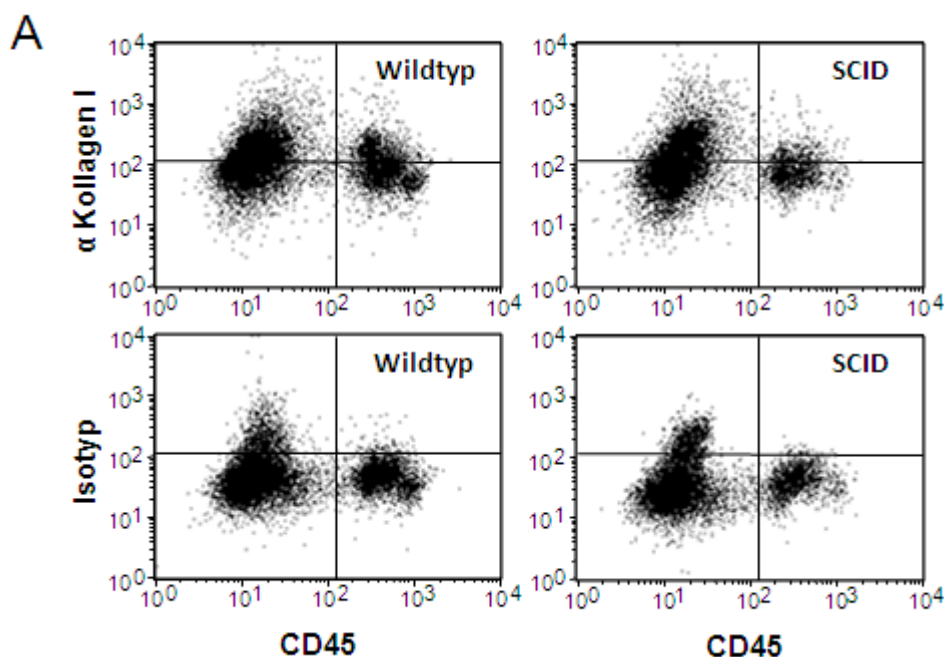


Abb. 31: Reduktion der Kollagen I Proteinexpression in ligierten Nieren von Mäusen nach Behandlung mit IL-2 und TNF- α . C57BL/6 Mäuse wurden von Tag 0-6 nach Induktion einer Fibrose durch eine einseitige Ureterligatur mit IL-2 und TNF- α oder PBS als Kontrolle behandelt (n = 5 pro Gruppe). Am Tag 7 wurden die ligierten Nieren (UUO Nieren) entnommen. Der Proteinnachweis erfolgte aus Lysaten von UUO Nieren von PBS-behandelten Kontrolltieren und IL-2 + TNF- α behandelten Tieren mittels Western-Blot. Als Kontrolle von Proteinmenge und Proteintransfer beim Blotten vom Gel auf die Membran wurde diese mit GAP-DH reinkubiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 2 Versuchen (A). Die Proteinexpression von Kollagen I wurde aus der Intensität der Banden im Vergleich zu den GAP-DH-Banden gemessen (B). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollgruppe ermittelt. $p < 0,05$ (*)

Die Behandlung von Mäusen mit IL-2 und TNF- α führte zu einer deutlichen Verminderung der Fibrozytenzahl, der Kollagen I-mRNA und der Ablagerung von Kollagen I in der abgebundenen Niere. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass IL-2 und TNF- α auch *in vivo* die Entwicklung von Fibrozyten unterdrücken und die Ablagerung von Kollagen I und damit die Nierenfibrose im Modell der einseitigen Ureterligatur zum Teil vermindern können.

3.6 Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf Fibrozyten *in vivo*

Aufgrund unserer in den Zellkulturversuchen gewonnenen Erkenntnisse konnten wir feststellen, dass nicht-aktivierte CD4⁺ T-Zellen, nicht aber CD19⁺ B-Zellen für die Entwicklung von reifen Fibrozyten aus ihren Vorläuferzellen eine Rolle spielen. Die *in vitro*-Depletion von CD4⁺ T-Zellen führte zu einem stark verminderten Auswachsen von spindelförmigen Fibrozyten aus murinen Splenozyten. Weiterhin konnte die Differenzierung von Fibrozyten durch die Zugabe von aufgereinigten unstimulierten CD4⁺ T-Zellen zu isolierten Monozyten deutlich verstärkt werden. Um diesen Einfluss von nicht-aktivierten CD4⁺ T-Zellen auf die Entwicklung von Fibrozyten *in vivo* näher zu untersuchen, wurde in CB-17 SCID-Mäusen (n=6, Kontrolle n=6) eine renale Fibrose durch eine einseitige Ureterligatur induziert. Diesen Tieren fehlen infolge eines hereditären DNA-Rekombinasedefektes reife T- und B-Zellen. Als Wildtypkontrolle dienten Balb/c-Mäuse. Sieben Tage nach der Fibroseinduktion wurden beiden Gruppen die beiden Nieren entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt, um diese durchflusszytometrisch auf infiltrierende CD45⁺, Kollagen I⁺ Fibrozyten zu untersuchen (Abb. 32 A). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zahl der eingewanderten Fibrozyten in den fibrotischen Nieren der CD4⁺ defizienten SCID-Mäuse deutlich niedriger lag als in den Wildtypkontrollen (Abb. 32 B).



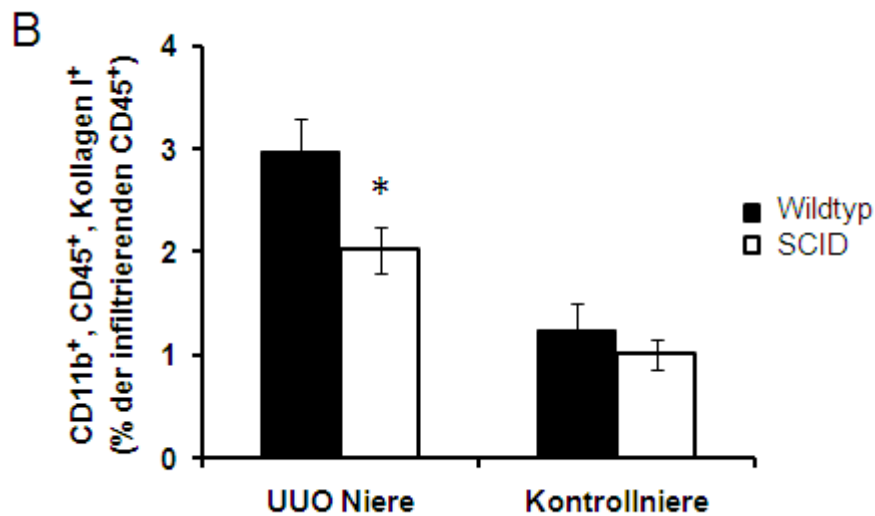


Abb. 32: Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf Fibrozyten *in vivo*. Am Tag 7 nach Induktion einer renalen Fibrose durch eine einseitige Ureterligatur in Balb/c Wildtypmäusen und T-Zell-defizienten CB-17 SCID-Mäusen wurden die fibrotische Niere (UUO Niere) und die gegenseitige Kontrollniere entnommen und Einzelzellsuspensionen im Durchflusszytometer auf die Expression von CD45 und CD11b auf der Oberfläche und von Kollagen I intrazellulär analysiert. Intrazellulär wurde Kaninchen IgG als Isotyp-Kontrolle mitgefärbt. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots von CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten in den UUO-Nieren von Wildtyp- und SCID-Mäusen (A) und die Zahl der CD45⁺, CD11b⁺, Kollagen I⁺ Fibrozyten als Prozent aller infiltrierenden CD45⁺ Zellen in der UUO Niere und der Kontrollniere von Wildtyp-Tieren (schwarze Balken) und SCID-Tieren (weiße Balken; B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 6 Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Wildtypgruppe bestimmt. $p < 0,05$ (*)

Der prozentuale Anteil der Fibrozyten an den einwandernden CD45⁺ Leukozyten in den fibrotischen Nieren der SCID-Mäuse machte dabei 2,03 % im Vergleich zu 2,98 % in den Wildtyp-Nieren aus. Die Fibrozyten stellten dabei 0,08 % der gesamten Nierenzellen im Gegensatz zu 0,14 % in den Wildtypkontrollen. Die immunhistochemische Untersuchung der Kryoschnitte von UUO-Nieren der SCID-Tiere zeigte zudem eine geringere Kollagen I-Anfärbung als die UUO-Schnitte von Wildtyp-Tieren (Abb. 33 A, B). Die Quantifizierung der gefärbten Flächte auf den Schnitten ergab eine um 2/3 verminderte Kollagen I-Ablagerung in den CD4⁺ defizienten SCID-Tieren im Vergleich zu den Wildtypen (Abb. 33 C). Aufgrund dieser Daten kann den CD4⁺ T-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung der Fibrozyten *in vitro* und *in vivo* zugesprochen werden.

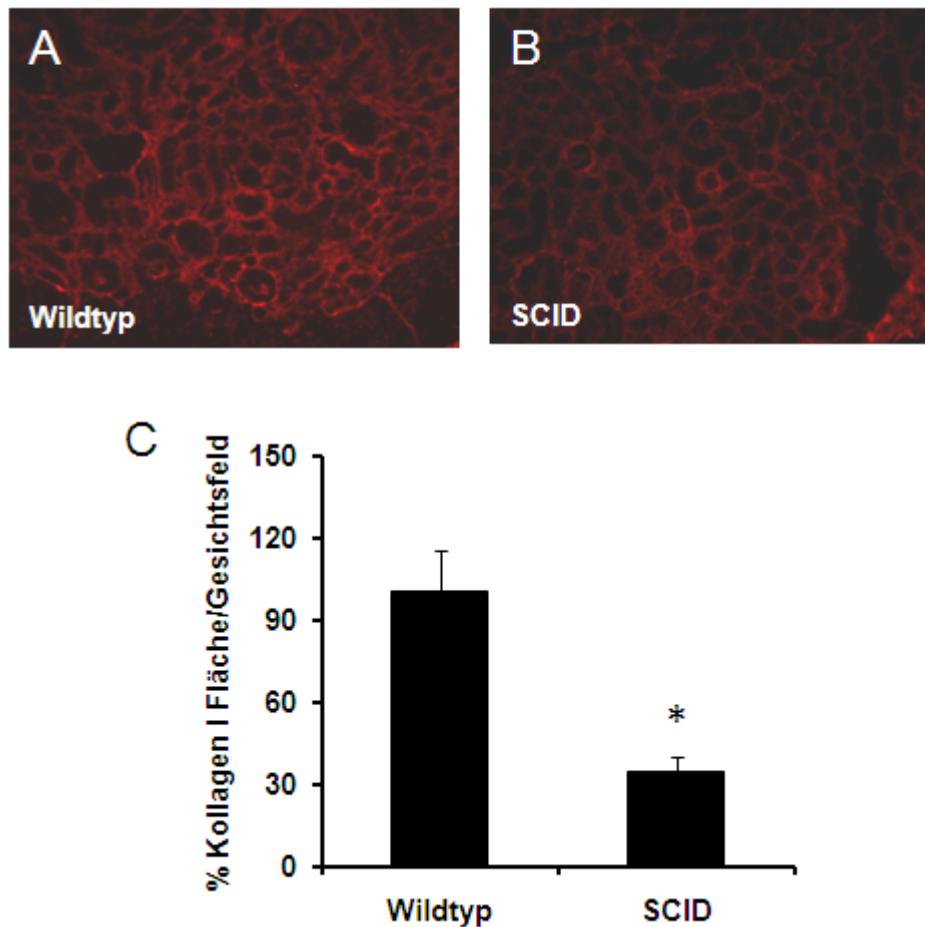
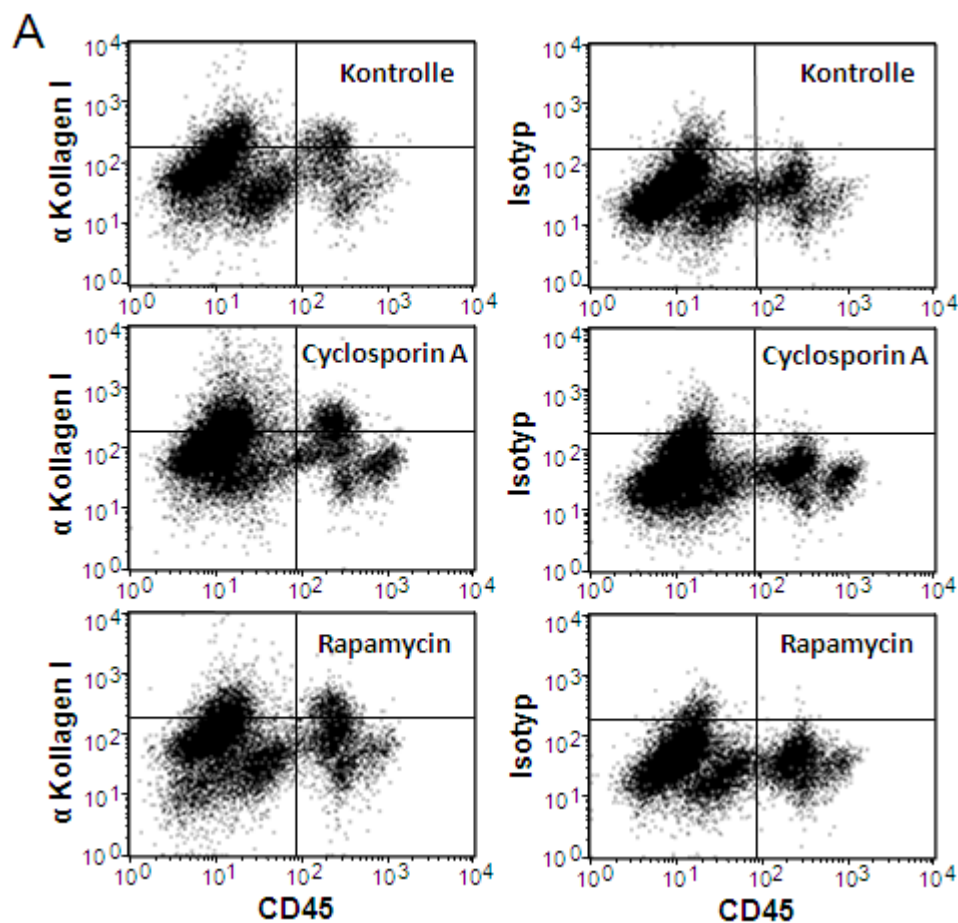


Abb. 33. Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf die Kollagen I-Ablagerung. Am Tag 7 nach Induktion einer renalen Fibrose durch eine einseitige Ureterligatur in Balb/c Wildtypmäusen und T-Zell-defizienten CB-17 SCID-Mäusen wurden die fibrotischen Nieren (UUO Niere) entnommen. Anschließend wurden Kryoschnitte dieser fibrotischen Nieren angefertigt und Kollagen I immunhistochemisch angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Kollagen I-gefärbten (rot) UUO Nieren von Wildtyp- (A) und SCID-Tieren (B) in einer 200-fachen Vergrößerung. Die rot gefärbte Fläche wurde quantifiziert (C). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM aus 5 Gesichtsfeldern/Schnitt von 6 Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollgruppe bestimmt. $p < 0,05$ (*)

3.7 Einfluss von Cyclosporin A und Rapamycin auf Fibrozyten und Nierenfibrose *in vivo*

Im Zellkulturmodell konnte deutlich gezeigt werden, dass der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A aktivierte T-Zellen zur Freisetzung von Faktoren anregt, die die Differenzierung von Fibrozyten aus ihren Vorläuferzellen stimulieren. Um das Einflussvermögen von Cyclosporin A auf die Entwicklung von Fibrozyten *in vivo* und deren Rolle bei der renalen Fibrose zu untersuchen, wurde wie bereits beschrieben an weiblichen C57BL/6 Mäusen eine einseitige Ureterligatur durchgeführt, um eine Nierenfibrose mit infiltrierenden Fibrozyten zu induzieren. Den Mäusen wurde vom Tag 0

bis zum Tag 6 nach der UUO täglich intraperitoneal 10 mg/kg Cyclosporin A (gelöst in Olivenöl) verabreicht. Zum Vergleich wurden weitere UUO-Mäuse mit 1,5 mg/kg Rapamycin in Olivenöl behandelt. Der mTOR-Inhibitor zeigte in der Zellkultur keine stimulatorische, sondern vielmehr eine inhibitorische Wirkung auf Monozyten und deren Differenzierung in reife Fibrozyten. Einer dritten Gruppe von UUO-Mäusen wurde reines Olivenöl als Vehikelkontrolle verabreicht. Drei Stunden später wurde allen Tieren 10 µg eines anti-CD3 Antikörpers appliziert, um eine polyklonale T-Zellaktivierung wie unter *in vitro*-Bedingungen zu erreichen. Die durchflusszytometrische Messung von Einzelzellsuspensionen der fibrotischen Nieren zeigte eine deutlich vermehrte Zahl an CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten in den UUO Nieren von Cyclosporin A-behandelten Tieren im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Abb. 34 A). Der Anteil an CD11b⁺, CD45⁺, Kollagen I⁺ Fibrozyten an den infiltrierenden CD45⁺ Zellen betrug in der Gruppe mit Cyclosporin A-Applikation 7,87 % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 4,78 % der infiltrierenden Zellen (Abb. 34 B).



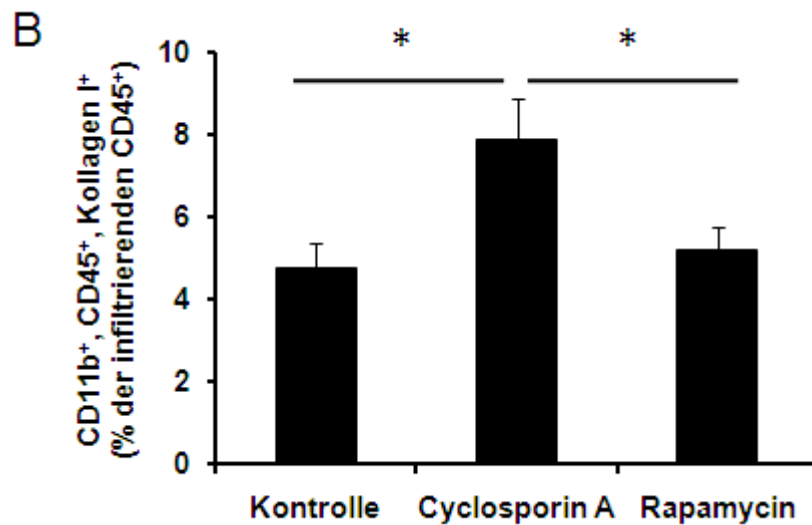


Abb. 34: Einfluss von Cyclosporin A und Rapamycin auf die Zahl der Fibrozyten in der ligierten Niere. C57BL/6 Mäuse wurden von Tag 0-6 nach Induktion einer einseitigen Ureterligatur mit 10 µg eines Antikörpers gegen CD3 zur polyklonalen Aktivierung von T-Zellen und Cyclosporin A (10 mg/kg), Rapamycin (1,5 mg/kg) oder Olivenöl als Vehikelkontrolle behandelt (n=5 pro Gruppe). Am Tag 7 wurden Einzelzellsuspensionen der ligierten Nieren (UUO Nieren) durchflusszytometrisch auf die Expression von CD45 und CD11b auf der Oberfläche und von Kollagen I intrazellulär im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle untersucht. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots von CD45⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten in den UUO-Nieren der drei Behandlungsgruppen (A) und die Zahl der CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen I⁺ Fibrozyten als Prozent aller infiltrierenden CD45⁺ Zellen in den UUO-Nieren (B). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SEM aus 5 Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollgruppe und zur Cyclosporin A-Gruppe bestimmt. p<0,05 (*)

Die Behandlung mit Cyclosporin A resultierte auch in einer erhöhten Expression von Kollagen I auf mRNA-Ebene in der abgebundenen Niere. Die Quantifizierung der Kollagen I-mRNA Spiegel mittels real-time RT-PCR zeigte eine Verdreifachung des Kollagen I-mRNA in den UUO Nieren der Cyclosporin A behandelten Mäuse (Abb. 35).

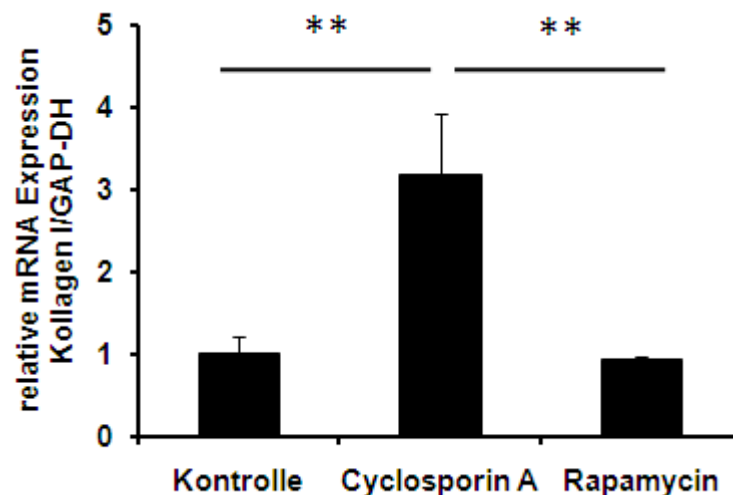


Abb. 35: Steigerung der Kollagen I mRNA-Expression in der ligierten Niere nach polyklonaler T-Zellaktivierung und Behandlung mit Cyclosporin A. C57BL/6 Mäuse wurden von Tag 0-6 nach Induktion einer einseitigen Ureterligatur mit 10 µg eines Antikörpers gegen CD3 zur polyklonalen Aktivierung von T-Zellen und Cyclosporin A (10 mg/kg), Rapamycin (1,5 mg/kg) oder Olivenöl als Vehikelkontrolle behandelt (n=5 pro Gruppe). Die Untersuchung der Kollagen I mRNA-Expression erfolgte nach der Organentnahme am Tag 7 in den UUO Nieren mittels real-time RT-PCR. mRNA-Levels wurden auf GAP-DH normalisiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM aus 5 Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollgruppe und zur Cyclosporin A-Gruppe ermittelt. $p < 0,01$ (**)

Die Applikation von Cyclosporin A führte zudem zu einer deutlichen Verstärkung der Fibrose, die sich in einer erhöhten Bildung von Kollagen I zeigte. Dieses wurde immunhistochemisch in Schnitten der fibrotischen Nieren angefärbt (Abb. 36 A, B, C) und anschließend quantifiziert (Abb. 36 D). Hierbei konnte eine Verdoppelung der Kollagen I-Bildung in den Cyclosporin A behandelten Mäusen im Vergleich zu den Vehikelkontrollen nachgewiesen werden. Die Verabreichung von Rapamycin dagegen zeigte keine eindeutigen Veränderungen der Zahl der Fibrozyten oder des Kollagen I-mRNA Spiegels im Vergleich zur Kontrolle. Auch der Grad der Fibrose der Rapamycin behandelten Mäuse glich nahezu dem der Kontrolltiere.

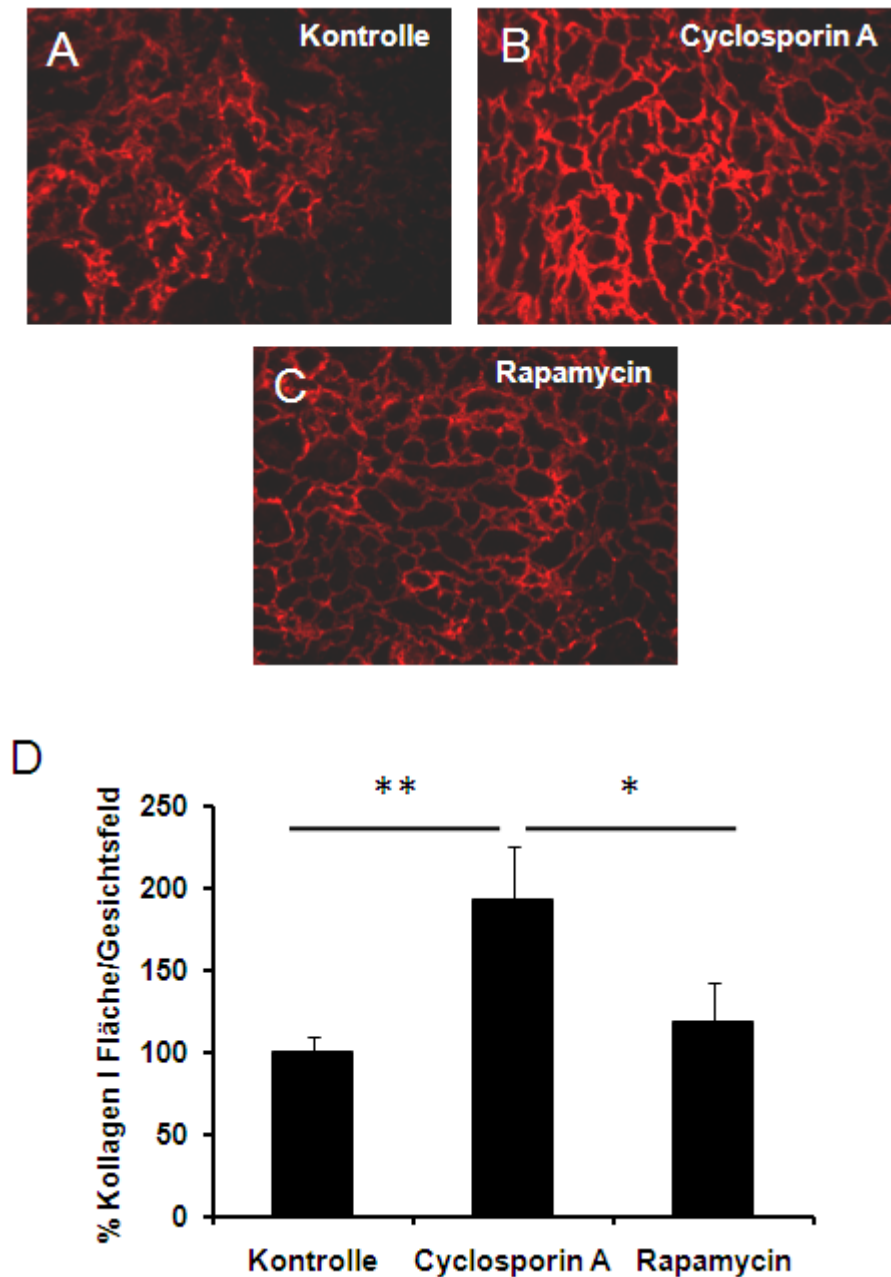


Abb. 36: Steigerung der Kollagen I Ablagerungen in der ligierten Niere nach polyklonaler T-Zellaktivierung und Behandlung mit Cyclosporin A. C57BL/6 Mäuse wurden von Tag 0-6 nach Induktion einer einseitigen Ureterligatur mit 10 µg eines Antikörpers gegen CD3 zur polyklonalen Aktivierung von T-Zellen und Cyclosporin A (10 mg/kg), Rapamycin (1,5 mg/kg) oder Olivenöl als Vehikelkontrolle behandelt (n=5 pro Gruppe). Immunhistochemisch wurde Kollagen I in Kryoschnitten von UUO Nieren nach der Organentnahme am Tag 7 angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Kollagen I-gefärbten (rot) UUO Nieren von Kontrolltieren (A) und Cyclosporin A- (B) bzw. Rapamycin-behandelten Tieren (C) in einer 200-fachen Vergrößerung. Die rot gefärbte Fläche wurde quantifiziert (D). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM aus 5 Gesichtsfeldern/Schnitt von 5 Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zur Kontrollgruppe und zur Cyclosporin A-Gruppe ermittelt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von Cyclosporin A die Entwicklung von Fibrozyten und die Expression von Kollagen I in der Niere begünstigt.

4. Diskussion

Die zelluläre Herkunft von Fibrozyten und Bedingungen, die eine Entwicklung von Fibrozyten in Kultur unterstützen oder vermindern, wurden bisher hauptsächlich in Zellkultursystemen mit humanen Zellen untersucht. Zudem existieren bisher nur wenige Daten zur Differenzierung von Fibrozyten *in vivo*. Aus diesem Grund haben wir im Mausmodell untersucht, welche Zellen die Fähigkeit besitzen, sich in reife Fibrozyten zu entwickeln und welche Faktoren oder Signale diese Differenzierung *in vitro* und *in vivo* beeinflussen und regulieren können.

Wie aus bereits bekannten Studien hervorgeht, ist die Identifizierung von Fibrozyten in fibrotischem Gewebe und Organen schwierig und es gibt keine einheitliche Strategie dafür. In dieser Arbeit wurde mit einer Reihe sich ergänzender Methoden wie der Durchlichtmikroskopie, der Durchflusszytometrie, RT-PCR und der Detektion von intrazellulärem und sezerniertem Kollagen I mit Hilfe der ELISA Technik versucht, Fibrozyten zu identifizieren und ihre Expression von Kollagen I zu bestätigen. Die Durchflusszytometrie mit der extrazellulären Anfärbung von CD45 und einer intrazellulären Färbung von Kollagen I zeigte sich dabei als eine sehr zuverlässige und reproduzierbare Methode, um Fibrozyten in Einzelzellsuspensionen nachzuweisen. So konnten wir in verschiedenen Depletionsversuchen und mit Hilfe isolierter Zellen zeigen, dass auch in der Maus monozytäre Zellen die Vorläufer für reife Fibrozyten darstellen. Eine *in vitro*-Depletion von CD11b, CD16/32 oder CD115 exprimierenden Zellen aus der Gesamtheit der Splenozyten verhinderte das Auswachsen von CD45⁺, Kollagen I⁺ Fibrozyten aus murinen Milzzellen nahezu vollständig. Dabei handelt es sich bei CD11b, CD16/32 und CD115 um für Monozyten charakteristische Oberflächen-Antigene. Der M-CSF-Rezeptor CD115 ist dabei wohl der spezifischste Marker für Monozyten in der Maus. Das verringerte Auswachsen von Fibrozyten nach einer Depletion von Gr-1⁺ Zellen zeigt, dass auch Gr-1⁺ Monozyten, für die bekannt ist, dass sie sich u. a. in Entzündungsherden ansammeln (23-25), die Fähigkeit besitzen, sich in Fibrozyten zu differenzieren. Im Modell einer renalen Fibrose infolge einer einseitigen Ureterligatur konnte im fibrotischen Nierengewebe eine deutliche Anhäufung von Monozyten und Makrophagen in einer Studie mit T-Zell-defizienten SCID-Mäusen gezeigt werden (90). Diese starke Infiltration von Monozyten und Makrophagen wird häufig in der sog. „Induzierungsphase“ einer tubulo-interstitiellen Nierenfibrose beschrieben (2;91-93).

Den CD4⁺ T-Zellen wurde bereits beim Menschen eine unterstützende Rolle bei der Differenzierung von Fibrozyten zugeschrieben (16). Diesen Effekt konnten wir auch für die Maus bestätigen. Eine Depletion von CD4⁺ T-Zellen führte zu einem nahezu vollständigen Ausbleiben der Entwicklung von Fibrozyten in der Kultur von murinen Milzzellen. Weiterhin resultierte die Kultur von aufgereinigten Monozyten in einem variablen Auswachsen einer geringen Zahl von Fibrozyten. Die Zugabe von CD4⁺ T-Zellen, die vorher keiner spezifischen Stimulation unterlagen, unterstützte die Entwicklung von Fibrozyten aus ihren Vorläufern deutlich. Durch den Überstand von unstimulierten CD4⁺ T-Zellen konnte dagegen die Entwicklung von Fibrozyten in keiner Weise gesteigert werden. Dies deutet darauf hin, dass ein direkter Zellkontakt zwischen CD4⁺ T-Zellen und den Vorläuferzellen von Fibrozyten notwendig ist. Die Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen unterstützt nicht nur die Differenzierung von Fibrozyten *in vitro*, sondern steigert auch die Zahl der Fibrozyten im Modell der einseitigen Ureterligatur, wie wir mit Hilfe T-Zell-defizienter SCID-Mäuse zeigen konnten.

Der Überstand aktivierter CD4⁺ T-Zellen hat einen ausgesprochen deutlichen Einfluss auf die Fibrozyten. Die polyklonale Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von Calcineurin-Inhibitoren führte zu einer Freisetzung löslicher Faktoren, die die Differenzierung von Monozyten in reife Fibrozyten nahezu vollständig verhinderten, während die Aktivierung von T-Zellen in Gegenwart von Calcineurin-Inhibitoren den gegenteiligen Effekt aufzeigte und zu einer verstärkten Entwicklung von Fibrozyten führte. Wir konnten die inhibitorischen Faktoren mit Hilfe einer großen Palette an monoklonalen Antikörpern gegen T-Zell-sekretierte Zytokine identifizieren. Dabei konnte nur bei der gleichzeitigen Blockade von vier Zytokinen in den inhibitorischen Überständen, nämlich IL-2, IL-4, TNF- α und IFN- γ ein Auswachsen von Fibrozyten wieder beobachtet werden. Die Blockade von drei dieser Zytokine im T-Zellüberstand führte nur zu einem marginalen Wieder-Auswachsen der Fibrozyten. Umgekehrt konnte die gleichzeitige Zugabe rekombinanter Zytokine, nämlich IL-2, IL-4, TNF- α und IFN- γ das Auswachsen der Fibrozyten ebenso wie der Überstand aktivierter T-Zellen verhindern. Während die Applikation einzelner Zytokine nur mäßige inhibitorische Wirkung zeigte, konnte durch verschiedene Kombinationen, dabei im Speziellen die Kombinationen aus IL-2 mit TNF- α , IL-4 oder IFN- γ das Auswachsen von Fibrozyten nahezu vollständig verhindert werden. Dies deutet an, dass die funktionale Blockade von Zytokinen mit Antikörpern, die in einer Konzentration von 20 μ g/ml verwendet wurden, entweder nicht vollständig war oder, was wahrscheinlicher ist, der Überstand aktivierter CD4⁺ T-Zellen weitere inhibitorische Zytokine enthält, die ihre Wirkung nur in Zusammenhang mit aktivem IL-2, IL-4, TNF- α

oder IFN- γ zeigen. Was die Wirkungsweise von einzelnen Zytokinen auf die Entwicklung von reifen Fibrozyten betrifft, haben sich aber auch Unterschiede zwischen Mensch und Maus aufgezeigt. So wird IL-4 beim Menschen als ein Zytokin beschrieben, das die Entwicklung von reifen Fibrozyten positiv beeinflusst und die Differenzierung aus monozytären Vorläufern deutlich verstärkt (26), wohingegen es in der Maus keinen Einfluss auf die Fibrozytendifferenzierung zu haben scheint. In Kombination mit weiteren Zytokinen kann es sogar ein Auswachsen von Fibrozyten stark vermindern. In Kulturen mit humanen Fibrozyten scheint TNF- α die Freisetzung von verschiedenen Chemokinen und Wachstumsfaktoren zu stimulieren (28). Es zeigt dabei allerdings keinerlei Einfluss auf die Proliferation der Fibrozyten (28). Im Gegensatz dazu zeigt TNF- α in Kombination mit anderen Zytokinen eine stark suppressive Wirkung auf die Entwicklung von murinen Fibrozyten aus ihren Vorläufern. IL-13 steigert dagegen sowohl im Mensch wie in der Maus die Kollagen I-Produktion (26). Darüberhinaus zeigte IFN- γ sowohl beim Menschen als auch in der Maus inhibitorische Eigenschaften, was die Differenzierung von Fibrozyten aus ihren Vorläufern betrifft (26).

Die Kombination aus den beiden Zytokinen IL-2 und TNF- α verhinderte das Auswachsen von Fibrozyten sogar, wenn die Differenzierung der Fibrozyten mit Gadolinium oder dem Überstand aktivierter CD4⁺ T-Zellen, der in Gegenwart von Cyclosporin A generiert wurde, stimuliert worden ist. Dies deutet darauf hin, dass IL-2 und TNF- α dominante Inhibitoren der Fibrozytendifferenzierung sind. Die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen während einer akuten Immunantwort und im Rahmen normaler Wundheilung mag wohl eine „restitutio ad integrum“, also das vollständige Ausheilen der Krankheit ohne die Bildung einer Fibrose bewirken und somit die normale Organfunktion wiederherstellen.

Eine anhaltende subakute Aktivierung von T-Zellen oder die Aktivierung von T-Zellen in Anwesenheit von Calcineurin-Inhibitoren wird bekannterweise mit dem Auftreten einer Fibrose assoziiert. Speziell eine Langzeittherapie mit Calcineurin-Inhibitoren und eine wiederkehrende Folge von Abstoßungsreaktionen in Transplantaten unter Calcineurin-Inhibitorbehandlung steigert das Risiko einer chronischen Transplantatdysfunktion und Fibrose wie sie häufig bei Patienten im Verlauf nach einer Nierentransplantation auftritt (78;94;95). Die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Tacrolimus (FK506), nicht aber der mTOR-Inhibitor Rapamycin verstärken die Freisetzung fibrozyten-fördernder Faktoren durch aktivierte CD4⁺ T-Zellen. Diese Beobachtung steht in Einklang mit einigen Berichten, die ein vermindertes Auftreten einer chronischen Transplantatnephropathie nach einer Behandlung mit mTOR-Inhibitoren beschreiben (96-98). Wir nehmen an, dass eine Aktivierung von T-Zellen in Gegenwart von Cyclosporin A die Freisetzung pro-

fibrotischer Faktoren begünstigt und die Freisetzung anti-fibrotischer Faktoren vermindert. Diese pro-fibrotischen Faktoren zeichnen sich durch Hitzelabilität aus und TGF- β ist Teil dieses Zusammenspiels verschiedener pro-fibrotischer Signale. Dabei stellen Fibrozyten möglicherweise einen neuen Angriffspunkt dar, um die Effekte dieser in Folge von Calcineurin-Inhibitorgabe freigesetzten pro-fibrotischen Faktoren zu verringern.

Fibrozyten wurden beim Menschen u. a. in starkem Maße im Krankheitsbild der nephrogenen systemischen Fibrose (NSF) nachgewiesen. Es sind hierbei vor allem Patienten mit starker Niereninsuffizienz betroffen. Seit einiger Zeit wird häufig über einen möglichen Zusammenhang mit der Gabe von gadolinium-haltigen Kontrastmitteln diskutiert. Aus diesem Grund haben wir die Wirkung von Gadolinium und Gd-haltigen Kontrastmitteln auf die Fibrozytendifferenzierung untersucht. Gadolinium, eingesetzt in einer Konzentration von 10 μ M und das Kontrastmittel Magnevist®, in einer Verdünnung von 1:1000, scheinen dabei die optimalen Konzentration zu sein, um das Wachstum von Fibrozyten zu begünstigen. Gewöhnlich wird Magnevist® für NMR-Untersuchungen mit 10-20 ml verabreicht. Dies führt zu einer 1:1000 Verdünnung in einem extrazellulären Flüssigkeitsvolumen von 10-20 l. Obwohl die Halbwertszeit von gadolinium-haltigen Kontrastmitteln in gesunden Patienten relativ kurz ist (ca. 90 min), verlängert sie sich in Dialysepatienten deutlich auf mehrere Tage. Dies entspricht auch annähernd dem Zeitraum von 14 Tagen, dem Zellen *in vitro* Gadolinium ausgesetzt wurden. Das vermehrte Auswachsen von spindelförmigen Fibrozyten nach Inkubation mit Gadolinium bestätigt so die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen Kontrastmittel-Applikation und NSF bei Patienten mit verminderter Nierenfunktion.

Die Identifikation von Fibrozyten in fibrotischen Organen und Geweben stellt eine gewisse Herausforderung dar. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden transgene Mäuse, die *green fluorescence protein* (GFP) unter der Kontrolle des Kollagen 1A1-Promotors und eines dazugehörigen Enhancers exprimieren, verwendet. Diese dienten als Donoren für Knochenmarkstransplantationen in gesunde Wildtypmäuse. In den knochenmarkschimären Mäusen wurden anschließend in sehr geringer Zahl GFP⁺ Zellen in den perivaskulären Bereichen fibrotischer Nieren 2-14 Tage nach einer einseitigen Ureterligatur nachgewiesen. In der gegenseitigen Niere konnten keine dieser Zellen detektiert werden (69). Die GFP⁺ Zellen exprimierten ebenso den Pan-Leukozytenmarker CD45 auf ihrer Oberfläche und konnten so als Fibrozyten identifiziert werden. In Studien mit Knochenmarkstransplantationen von transgenen Tieren scheint die Zahl der Fibrozyten in der Niere unterschätzt zu werden. Möglicherweise werden nach einer Transplantation nicht alle Leukozyten-Subpopulationen in gleicher Weise

wiederhergestellt oder das Transgen wird nicht in allen Zellpopulationen vollständig exprimiert. In einer weiteren Arbeit konnten Fibrozyten immunhistochemisch durch eine Doppelfärbung von CD45 und Kollagen I oder CC7 und Kollagen I in Nieren nach einer einseitigen Ureterligatur nachgewiesen werden. Hierbei wurde die Einwanderung der Fibrozyten in die Niere unter Abhängigkeit von CCR7 gezeigt. In der vorliegenden Arbeit haben wir durchflusszytometrisch mit einer extrazellulären Färbung von CD45 und intrazellulärem Färben von Kollagen I Fibrozyten in Einzelzellsuspensionen, die nach Kollagenaseverdau von fibrotischen Nieren nach einseitiger Ureterligatur hergestellt wurden, nachgewiesen. Dabei konnten eindeutig Kollagen I⁺ Zellen in einer Subpopulation infiltrierender CD45⁺ Zellen in die ligierte Niere und in einem viel geringeren Maße auch in der gegenseitigen Niere und der Milz nachgewiesen werden. Die Expression von Kollagen I wurde auf mRNA-Ebene bestätigt. Dafür wurden CD45⁺ Zellen der fibrotischen und der gegenseitigen Niere sowie der Milz zuerst durch magnetische Microbeads angereichert und anschließend sauber mit Hilfe des FACS-sorts aufgereinigt. CD45⁺ Zellen der fibrotischen Niere exprimieren dabei deutlich höhere Kollagen I-mRNA Spiegel als CD45⁺ Zellen der Milz oder der gegenseitigen Niere. Im Modell der einseitigen Ureterligatur wurde daraufhin nach der Applikation von IL-2 und TNF- α untersucht, welche Einflussmöglichkeiten diese Zytokine auf die Fibrozyten *in vivo* haben und ob sie ihre Zahl und damit vielleicht den Gesamtgehalt der Fibrose in der ligierten Niere reduzieren können. Eine gemeinsame Gabe von IL-2 und TNF- α verringerte die Zahl der Fibrozyten in der ligierten Niere beinahe um 30 %. Dies deutet darauf hin, dass die Zytokine IL-2 und TNF- α also auch *in vivo* die Entwicklung der Fibrozyten beeinflussen. Parallel dazu konnte auch ein signifikanter Rückgang der Kollagen I-Expression auf mRNA-Ebene und der Kollagen I-Ablagerung auf Protein-Ebene in den ligierten Nieren der IL-2 und TNF- α behandelten Tiere nachgewiesen werden. Die Korrelation der Zahl der infiltrierenden Fibrozyten und des Grades der Fibrose scheint auf eine Beteiligung der Fibrozyten an der Nierenfibrose in diesem Model hinzudeuten. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass IL-2 und TNF- α auch auf die Kollagen I-Produktion von Fibroblasten, Myofibroblasten und Pericyten Einfluss nehmen.

Weiterhin haben wir *in vivo* untersucht, ob Cyclosporin A in Gegenwart aktivierter T-Zellen die Entwicklung der Fibrozyten steigert. Dazu wurden Mäuse, die einer einseitigen Ureterligatur unterzogen wurden, zum Einen mit Antikörpern gegen CD3 behandelt, um eine polyklonale T-Zellaktivierung zu induzieren, und zum Anderen erhielten die Tiere Cyclosporin A, Rapamycin oder Olivenöl als Vehikelkontrolle. Ähnlich unseren *in vitro*-Ergebnissen beobachteten wir eine deutlich angestiegene Zahl an CD45⁺, Kollagen I⁺

Fibrozyten und eine vermehrte Expression von Kollagen I auf mRNA-Ebene in den fibrotischen Nieren der mit Cyclosporin A behandelten Tieren. Die Rapamycin behandelten Tiere zeigten diese Effekte nicht. Somit kann eine Aktivierung von T-Zellen in Anwesenheit von Cyclosporin A auch *in vivo* die Entwicklung von Fibrozyten positiv beeinflussen und es kommt zu einer Verschlimmerung der Fibrose in der ligierten Niere.

Zusammenfassend können wir daher feststellen, dass die Differenzierung von Fibrozyten von CD4⁺ T-Zellen und von diesen produzierten Faktoren abhängig ist. In der gängigen immunsuppressiven Therapie verabreichte Medikamente verändern dabei deutlich die Fähigkeit von CD4⁺ T-Zellen, die Fibrozyten in ihrer Entwicklung zu unterstützen. Unsere Daten erklären möglicherweise den Mechanismus, warum infolge von akuten im Gegensatz zu chronischen Immunantworten, die unter Behandlung von Calcineurin-Inhibitoren ablaufen, in unterschiedlicher Weise Organfibrosen auftreten.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fibrozyten im Modell der einseitigen Ureterligatur Anteil an der Kollagen I-Bildung in der renalen Fibrose haben. Die relative Beteiligung der verschiedenen Zelltypen, die Kollagen I in der Niere produzieren können, bleibt dabei aber weiterhin als offene Frage bestehen.

5. Zusammenfassung

Bei einer Vielzahl von Nierenerkrankungen kommt es infolge einer chronischen Schädigung häufig zu einer Defektheilung mit fibrotischem Gewebsumbau und progredientem, meist irreversiblen Funktionsverlust. Die tubulo-interstitielle Nierenfibrose ist dabei neben Tubulusatrophie und Tubulusdilataion von einer vermehrten Einlagerung extrazellulärer Matrixproteine gekennzeichnet. Diese führen zu einer Verdrängung der für die Organfunktion notwendigen, spezifischen Zellen und bedingen somit den Funktionsverlust des gesamten Organs. Aufgrund neuerer Daten muss man davon ausgehen, dass auch Zellen hämatopoietischen Ursprungs, sogenannte Fibrozyten an der Bildung dieser extrazellulären Matrixproteine und an der Fibroseentstehung beteiligt sind. Diese Fibrozyten sind Kollagen Typ I produzierende Zellen, die sich unter bestimmten Bedingungen aus Vorläuferzellen des peripheren Blutes entwickeln. Sie vereinen die Eigenschaften von Zellen mit hämatopoietischer Herkunft durch die Expression von Oberflächenmolekülen wie CD34 und CD45 mit denen von Zellen mesenchymalen Ursprungs. Sie bilden ähnlich den Fibroblasten extrazelluläre Matrixkomponenten wie Kollagen I und können sich zu Myofibroblasten weiterdifferenzieren. Der genaue zelluläre Ursprung der Fibrozyten ist dabei jedoch noch nicht vollständig geklärt. In einem *in vitro*-Modell mit murinen Splenozyten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich murine Fibrozyten aus einer Subpopulation von CD11b⁺, CD115⁺, Gr-1⁺ Monozyten differenzieren. Für die Entwicklung der reifen Fibrozyten aus diesen monozytären Vorläuferzellen spielt die Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen und von diesen produzierte Faktoren eine entscheidende Rolle. Eine polyklonale Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen induziert nämlich die Freisetzung von löslichen Faktoren, die die Differenzierung von Fibrozyten vollständig hemmen. Diese Faktoren konnten als IL-2, TNF- α , IFN- γ und IL-4 identifiziert werden. Die Kombination von IL-2 und TNF- α blockiert die Fibrozytenentwicklung *in vitro* und vermindert zudem auch die Zahl der Fibrozyten *in vivo*. Im Modell der einseitigen Ureterligatur (UUO) wurde zunächst der Nachweis von Fibrozyten und deren Beteiligung an der renalen Fibrose erbracht. Eine Applikation von IL-2 und TNF- α nach Induktion einer UUO bei Mäusen führte zu einer stark verminderten Zahl an Fibrozyten in der fibrotischen Niere im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Darüberhinaus war der Gesamtfibrosegrad nach der Behandlung mit IL-2 und TNF- α deutlich reduziert.

Im Gegensatz dazu führt eine polyklonale Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von Calcineurin-Inhibitoren, nicht aber von mTOR-Inhibitoren zu einem deutlich vermehrten Auswachsen von Fibrozyten *in vitro*. In einem kombinierten Modell der einseitigen Ureterligatur mit polyklonaler T-Zellaktivierung bei Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A im Gegensatz zur Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin die Zahl der Fibrozyten in der fibrotischen Niere erhöht sowie einen Anstieg des Grades der Gesamtfibrose in der Niere bedingt.

Unsere Daten zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen und von diesen sekretierte Faktoren die Differenzierung von Fibrozyten *in vitro* und *in vivo* maßgeblich beeinflussen. Medikamente der allgemeinen Immuntherapie nach Transplantation verändern dabei die Fähigkeit der CD4⁺ T-Zellen, auf die Entwicklung der Fibrozyten Einfluss zu nehmen. Dies könnte erklären, warum sich infolge akuter Immunreaktionen selten Fibrosen entwickeln, wohingegen infolge von Abstoßungsreaktionen unter der Gabe von Calcineurin-Inhibitoren häufig interstitielle Nierenfibrosen und chronische Transplantatnephropathien auftreten. Fibrozyten stellen möglicherweise einen neuen Angriffspunkt dar, um profibrotische Effekte von Calcineurin-Inhibitoren zu verringern.

6. Abkürzungen

α	anti
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ASM	<i>airway smooth muscle</i>
α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
AT2R	Angiotensin Typ 2 Rezeptor
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
bp	Basenpaare
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BMP-7	<i>Bone Morphogenetic Protein-7</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CCL	CC-Motiv-Chemokin
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i> ; Oberflächenmerkmale von Zellen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CyA	Cyclosporin A
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung
EndMT	Endothelial-mesenchymale Transition

ET-1	Endothelin-1
et al.	et alii (lat. und andere)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FcR γ	Fc receptor γ -chain
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
FKBP	FK506 Bindeprotein
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtstreulicht (<i>forward scatter</i>) im Durchflusszytometer
FSP-1	<i>Fibroblast-specific Protein-1</i>
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horse radish peroxidase</i>)
HPF	Hauptgesichtsfeld
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
LSP-1	<i>Leukocyte-specific Protein 1</i>
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> (CCL2)
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigene
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MMP-9	Matrixmetallopeptidase 9
MR	Magnetresonanz
mRNA	Boten-(messenger-)Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NA/LE	<i>no azid/low endotoxin</i>

NF-AT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NSF	Nephrogene systemische Fibrose
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PE	R-Phycoerythrin
Rapa	Rapamycin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SAP	Serumamyloid P
s.c.	subkutan
SDF-1	<i>Stromal cell-derived Factor-1</i> (CXCL12)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SLC	<i>Secondary Lymphoid-tissue Chemokine</i> (CCL21)
SN	Überstand polyklonal aktivierter CD4 ⁺ T-Zellen
SN CyA	Überstand von in Anwesenheit von Cyclosporin A polyklonal aktivierter CD4 ⁺ T-Zellen
SN FK506	Überstand von in Anwesenheit von FK506 polyklonal aktivierter CD4 ⁺ T-Zellen
SN Rapa	Überstand von in Anwesenheit von Rapamycin polyklonal aktivierter CD4 ⁺ T-Zellen
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>) im Durchflusszytometer
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	α,α,α -Tris(Hydroxymethyl)-Methylamin
U	Unit
u.a.	unter anderem

UUO	einseitige Ureterligatur
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vol/vol	Volumen pro Volumen
wt/vol	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

1. Klahr, S. 2001. Progression of chronic renal disease. *Heart Dis.* **3**:205-209.
2. Strutz, F., and Muller, G.A. 1999. Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press Res.* **22**:71-80.
3. Strutz, F., and Zeisberg, M. 2006. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**:2992-2998.
4. Picard, N., Baum, O., Vogetseder, A., Kaissling, B., and Le, H.M. 2008. Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat. *Histochem. Cell Biol.* **130**:141-155.
5. Strutz, F., Zeisberg, M., Hemmerlein, B., Sattler, B., Hummel, K., Becker, V., and Muller, G.A. 2000. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int.* **57**:1521-1538.
6. Strutz, F., Okada, H., Lo, C.W., Danoff, T., Carone, R.L., Tomaszewski, J.E., and Neilson, E.G. 1995. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J. Cell Biol.* **130**:393-405.
7. Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest* **110**:341-350.
8. Zeisberg, M., Bonner, G., Maeshima, Y., Colorado, P., Muller, G.A., Strutz, F., and Kalluri, R. 2001. Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am. J. Pathol.* **159**:1313-1321.
9. Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., and Kalluri, R. 2003. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat. Med.* **9**:964-968.
10. Zeisberg, E.M., Potenta, S.E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. 2008. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**:2282-2287.
11. Herzlinger, D., Koseki, C., Mikawa, T., and al Awqati, Q. 1992. Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction. *Development* **114**:565-572.
12. Oliver, J.A., Barasch, J., Yang, J., Herzlinger, D., and al Awqati, Q. 2002. Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **283**:F799-F809.
13. Bucala, R., Spiegel, L.A., Chesney, J., Hogan, M., and Cerami, A. 1994. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol. Med.* **1**:71-81.
14. Hashimoto, N., Jin, H., Liu, T., Chensue, S.W., and Phan, S.H. 2004. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest* **113**:243-252.

15. Phillips,R.J., Burdick,M.D., Hong,K., Lutz,M.A., Murray,L.A., Xue,Y.Y., Belperio,J.A., Keane,M.P., and Strieter,R.M. 2004. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J. Clin. Invest* **114**:438-446.
16. Abe,R., Donnelly,S.C., Peng,T., Bucala,R., and Metz,C.N. 2001. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J. Immunol.* **166**:7556-7562.
17. Pilling,D., Buckley,C.D., Salmon,M., and Gomer,R.H. 2003. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J. Immunol.* **171**:5537-5546.
18. Pilling,D., Tucker,N.M., and Gomer,R.H. 2006. Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes. *J. Leukoc. Biol.* **79**:1242-1251.
19. Schmidt,M., Sun,G., Stacey,M.A., Mori,L., and Mattoli,S. 2003. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J. Immunol.* **171**:380-389.
20. Yang,L., Scott,P.G., Giuffre,J., Shankowsky,H.A., Ghahary,A., and Tredget,E.E. 2002. Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. *Lab Invest* **82**:1183-1192.
21. Varcoe,R.L., Mikhail,M., Guiffre,A.K., Pennings,G., Vicaretti,M., Hawthorne,W.J., Fletcher,J.P., and Medbury,H.J. 2006. The role of the fibrocyte in intimal hyperplasia. *J. Thromb. Haemost.* **4**:1125-1133.
22. Haudek,S.B., Xia,Y., Huebener,P., Lee,J.M., Carlson,S., Crawford,J.R., Pilling,D., Gomer,R.H., Trial,J., Frangogiannis,N.G. et al 2006. Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:18284-18289.
23. Gordon,S., and Taylor,P.R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev Immunol.* **5**:953-964.
24. Tacke,F., and Randolph,G.J. 2006. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* **211**:609-618.
25. Sunderkotter,C., Nikolic,T., Dillon,M.J., Van Rooijen,N., Stehling,M., Drevets,D.A., and Leenen,P.J. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* **172**:4410-4417.
26. Shao,D.D., Suresh,R., Vakil,V., Gomer,R.H., and Pilling,D. 2008. Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J. Leukoc. Biol.* **83**:1323-1333.
27. Labat,M.L., Bringuier,A.F., Arys-Philippart,C., Arys,A., and Wellens,F. 1994. Monocytic origin of fibrosis. In vitro transformation of HLA-DR monocytes into neo-fibroblasts: inhibitory effect of all-trans retinoic acid on this process. *Biomed. Pharmacother.* **48**:103-111.
28. Chesney,J., Metz,C., Stavitsky,A.B., Bacher,M., and Bucala,R. 1998. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J. Immunol.* **160**:419-425.

29. Bucala,R. 2008. Circulating fibrocytes: cellular basis for NSF. *J. Am. Coll. Radiol.* **5**:36-39.
30. Sakai,N., Wada,T., Yokoyama,H., Lipp,M., Ueha,S., Matsushima,K., and Kaneko,S. 2006. Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:14098-14103.
31. Quan,T.E., Cowper,S., Wu,S.P., Bockenstedt,L.K., and Bucala,R. 2004. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**:598-606.
32. Moore,B.B., Kolodsick,J.E., Thannickal,V.J., Cooke,K., Moore,T.A., Hogaboam,C., Wilke,C.A., and Toews,G.B. 2005. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am. J. Pathol.* **166**:675-684.
33. Moore,B.B., Murray,L., Das,A., Wilke,C.A., Herrygers,A.B., and Toews,G.B. 2006. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**:175-181.
34. Strieter,R.M., Gomperts,B.N., and Keane,M.P. 2007. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest* **117**:549-556.
35. Hartlapp,I., Abe,R., Saeed,R.W., Peng,T., Voelter,W., Bucala,R., and Metz,C.N. 2001. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J.* **15**:2215-2224.
36. Wang,J.F., Jiao,H., Stewart,T.L., Shankowsky,H.A., Scott,P.G., and Tredget,E.E. 2007. Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts. *Wound. Repair Regen.* **15**:113-121.
37. Chesney,J., Bacher,M., Bender,A., and Bucala,R. 1997. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:6307-6312.
38. Balmelli,C., Ruggli,N., McCullough,K., and Summerfield,A. 2005. Fibrocytes are potent stimulators of anti-virus cytotoxic T cells. *J. Leukoc. Biol.* **77**:923-933.
39. Mori,L., Bellini,A., Stacey,M.A., Schmidt,M., and Mattoli,S. 2005. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp. Cell Res.* **304**:81-90.
40. Kisseleva,T., Uchinami,H., Feirt,N., Quintana-Bustamante,O., Segovia,J.C., Schwabe,R.F., and Brenner,D.A. 2006. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J. Hepatol.* **45**:429-438.
41. Frid,M.G., Brunetti,J.A., Burke,D.L., Carpenter,T.C., Davie,N.J., Reeves,J.T., Roedersheimer,M.T., Van Rooijen,N., and Stenmark,K.R. 2006. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am. J. Pathol.* **168**:659-669.
42. Ishii,G., Sangai,T., Sugiyama,K., Ito,T., Hasebe,T., Endoh,Y., Magae,J., and Ochiai,A. 2005. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* **23**:699-706.

43. Ishida,Y., Kimura,A., Kondo,T., Hayashi,T., Ueno,M., Takakura,N., Matsushima,K., and Mukaida,N. 2007. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. *Am. J. Pathol.* **170**:843-854.
44. Sakai,N., Wada,T., Matsushima,K., Bucala,R., Iwai,M., Horiuchi,M., and Kaneko,S. 2008. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *J. Hypertens.* **26**:780-790.
45. Uehara,H., Nakagawa,T., Katsuno,T., Sato,T., Isono,A., Noguchi,Y., and Saito,Y. 2009. Emergence of Fibrocytes Showing Morphological Changes in the Inflamed Colonic Mucosa. *Dig. Dis. Sci.*
46. Hartlapp,I., Abe,R., Saeed,R.W., Peng,T., Voelter,W., Bucala,R., and Metz,C.N. 2001. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J.* **15**:2215-2224.
47. Metz,C.N. 2003. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. *Cell Mol. Life Sci.* **60**:1342-1350.
48. Ishida,Y., Kimura,A., Takayasu,T., Eisenmenger,W., and Kondo,T. 2009. Detection of fibrocytes in human skin wounds and its application for wound age determination. *Int. J. Legal Med.*
49. Ortiz,L.A., Dutreil,M., Fattman,C., Pandey,A.C., Torres,G., Go,K., and Phinney,D.G. 2007. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:11002-11007.
50. Aiba,S., and Tagami,H. 1997. Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids. *J. Cutan. Pathol.* **24**:65-69.
51. Yang,L., Scott,P.G., Dodd,C., Medina,A., Jiao,H., Shankowsky,H.A., Ghahary,A., and Tredget,E.E. 2005. Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound. Repair Regen.* **13**:398-404.
52. Nihlberg,K., Larsen,K., Hultgardh-Nilsson,A., Malmstrom,A., Bjermer,L., and Westergren-Thorsson,G. 2006. Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane? *Respir. Res.* **7**:50.
53. Kaur,D., Saunders,R., Berger,P., Siddiqui,S., Woodman,L., Wardlaw,A., Bradding,P., and Brightling,C.E. 2006. Airway smooth muscle and mast cell-derived CC chemokine ligand 19 mediate airway smooth muscle migration in asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **174**:1179-1188.
54. Wang,C.H., Huang,C.D., Lin,H.C., Lee,K.Y., Lin,S.M., Liu,C.Y., Huang,K.H., Ko,Y.S., Chung,K.F., and Kuo,H.P. 2008. Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **178**:583-591.
55. Saunders,R., Siddiqui,S., Kaur,D., Doe,C., Sutcliffe,A., Hollins,F., Bradding,P., Wardlaw,A., and Brightling,C.E. 2009. Fibrocyte localization to the airway smooth muscle is a feature of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**:376-384.

56. Choi,E.S., Pierce,E.M., Jakubzick,C., Carpenter,K.J., Kunkel,S.L., Evanoff,H., Martinez,F.J., Flaherty,K.R., Moore,B.B., Toews,G.B. et al 2006. Focal interstitial CC chemokine receptor 7 (CCR7) expression in idiopathic interstitial pneumonia. *J. Clin. Pathol.* **59**:28-39.
57. Mehrad,B., Burdick,M.D., Zisman,D.A., Keane,M.P., Belperio,J.A., and Strieter,R.M. 2007. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**:104-108.
58. Andersson-Sjoland,A., de Alba,C.G., Nihlberg,K., Becerril,C., Ramirez,R., Pardo,A., Westergren-Thorsson,G., and Selman,M. 2008. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**:2129-2140.
59. Moeller,A., Gilpin,S.E., Ask,K., Cox,G., Cook,D., Gauldie,J., Margetts,P.J., Farkas,L., Dobranowski,J., Boylan,C. et al 2009. Circulating Fibrocytes Are an Indicator for Poor Prognosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.*
60. Moore,B.B. 2009. Fibrocytes as potential biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **179**:524-525.
61. Grobner,T. 2006. Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol. Dial. Transplant.*
62. Morcos,S.K., and Thomsen,H.S. 2008. Nephrogenic systemic fibrosis: more questions and some answers. *Nephron Clin. Pract.* **110**:c24-c31.
63. Perazella,M.A. 2007. Nephrogenic systemic fibrosis, kidney disease, and gadolinium: is there a link? *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2**:200-202.
64. Cowper,S.E., and Bucala,R. 2003. Nephrogenic fibrosing dermopathy: suspect identified, motive unclear. *Am. J. Dermatopathol.* **25**:358.
65. Schroeder,J.A., Weingart,C., Coras,B., Hausser,I., Reinhold,S., Mack,M., Seybold,V., Vogt,T., Banas,B., Hofstaedter,F. et al 2008. Ultrastructural evidence of dermal gadolinium deposits in a patient with nephrogenic systemic fibrosis and end-stage renal disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3**:968-975.
66. Ortonne,N., Lipsker,D., Chantrel,F., Boehm,N., Grosshans,E., and Cribier,B. 2004. Presence of CD45RO+ CD34+ cells with collagen synthesis activity in nephrogenic fibrosing dermopathy: a new pathogenic hypothesis. *Br. J. Dermatol.* **150**:1050-1052.
67. Jimenez,S.A., Artlett,C.M., Sandorfi,N., Derk,C., Latinis,K., Sawaya,H., Haddad,R., and Shanahan,J.C. 2004. Dialysis-associated systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy): study of inflammatory cells and transforming growth factor beta1 expression in affected skin. *Arthritis Rheum.* **50**:2660-2666.
68. Roufosse,C., Bou-Gharios,G., Prodromidi,E., Alexakis,C., Jeffery,R., Khan,S., Otto,W.R., Alter,J., Poulson,R., and Cook,H.T. 2006. Bone marrow-derived cells do not contribute significantly to collagen I synthesis in a murine model of renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**:775-782.

-
69. Lin,S.L., Kisseleva,T., Brenner,D.A., and Duffield,J.S. 2008. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am. J. Pathol.* **173**:1617-1627.
 70. Wynn,T.A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* **214**:199-210.
 71. Pesce,J., Kaviratne,M., Ramalingam,T.R., Thompson,R.W., Urban,J.F., Jr., Cheever,A.W., Young,D.A., Collins,M., Grusby,M.J., and Wynn,T.A. 2006. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J. Clin. Invest* **116**:2044-2055.
 72. Reiman,R.M., Thompson,R.W., Feng,C.G., Hari,D., Knight,R., Cheever,A.W., Rosenberg,H.F., and Wynn,T.A. 2006. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect. Immun.* **74**:1471-1479.
 73. Chiamonte,M.G., Donaldson,D.D., Cheever,A.W., and Wynn,T.A. 1999. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J. Clin. Invest* **104**:777-785.
 74. Wynn,T.A., Cheever,A.W., Jankovic,D., Poindexter,R.W., Caspar,P., Lewis,F.A., and Sher,A. 1995. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* **376**:594-596.
 75. Cheever,A.W., Williams,M.E., Wynn,T.A., Finkelman,F.D., Seder,R.A., Cox,T.M., Hieny,S., Caspar,P., and Sher,A. 1994. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J. Immunol.* **153**:753-759.
 76. Sempowski,G.D., Beckmann,M.P., Derdak,S., and Phipps,R.P. 1994. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J. Immunol.* **152**:3606-3614.
 77. Doucet,C., Brouty-Boye,D., Pottin-Clemenceau,C., Canonica,G.W., Jasmin,C., and Azzarone,B. 1998. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J. Clin. Invest* **101**:2129-2139.
 78. Andoh,T.F., and Bennett,W.M. 1998. Chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **7**:265-270.
 79. Opelz,G., and Dohler,B. 2001. Cyclosporine and long-term kidney graft survival. *Transplantation* **72**:1267-1273.
 80. Olyaei,A.J., de Mattos,A.M., and Bennett,W.M. 2001. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr. Opin. Crit Care* **7**:384-389.
 81. Shihab,F.S. 1996. Cyclosporine nephropathy: pathophysiology and clinical impact. *Semin. Nephrol.* **16**:536-547.

-
82. Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S.L. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**:807-815.
83. Li, B., Sehajpal, P.K., Khanna, A., Vlassara, H., Cerami, A., Stenzel, K.H., and Suthanthiran, M. 1991. Differential regulation of transforming growth factor beta and interleukin 2 genes in human T cells: demonstration by usage of novel competitor DNA constructs in the quantitative polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* **174**:1259-1262.
84. Prashar, Y., Khanna, A., Sehajpal, P., Sharma, V.K., and Suthanthiran, M. 1995. Stimulation of transforming growth factor-beta 1 transcription by cyclosporine. *FEBS Lett.* **358**:109-112.
85. Grobner, T., and Prischl, F.C. 2007. Gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis. *Kidney Int.* **72**:260-264.
86. Idee, J.M., Port, M., Medina, C., Lancelot, E., Fayoux, E., Ballet, S., and Corot, C. 2008. Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a critical review. *Toxicology* **248**:77-88.
87. Vielhauer, V., Anders, H.J., Mack, M., Cihak, J., Strutz, F., Stangassinger, M., Luckow, B., Grone, H.J., and Schlondorff, D. 2001. Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**:1173-1187.
88. Bascands, J.L., and Schanstra, J.P. 2005. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int.* **68**:925-937.
89. Wada, T., Sakai, N., Matsushima, K., and Kaneko, S. 2007. Fibrocytes: a new insight into kidney fibrosis. *Kidney Int.* **72**:269-273.
90. Shappell, S.B., Gurpinar, T., Lechago, J., Suki, W.N., and Truong, L.D. 1998. Chronic obstructive uropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice: lymphocyte infiltration is not required for progressive tubulointerstitial injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**:1008-1017.
91. Muller, G.A., Markovic-Lipkovski, J., Frank, J., and Rodemann, H.P. 1992. The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2**:S198-S205.
92. Young, B.A., Burdmann, E.A., Johnson, R.J., Alpers, C.E., Giachelli, C.M., Eng, E., Andoh, T., Bennett, W.M., and Couser, W.G. 1995. Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* **48**:439-448.
93. Diamond, J.R., Ricardo, S.D., and Klahr, S. 1998. Mechanisms of interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Semin. Nephrol.* **18**:594-602.
94. Najafian, B., and Kasiske, B.L. 2008. Chronic allograft nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**:149-155.

95. Nankivell,B.J., Borrows,R.J., Fung,C.L., O'Connell,P.J., Chapman,J.R., and Allen,R.D. 2004. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* **78**:557-565.
96. Dean,P.G., Grande,J.P., Sethi,S., Park,W.D., Griffin,M.D., Cosio,F.G., Larson,T.S., and Stegall,M.D. 2008. Kidney transplant histology after one year of continuous therapy with sirolimus compared with tacrolimus. *Transplantation* **85**:1212-1215.
97. Flechner,S.M., Kurian,S.M., Solez,K., Cook,D.J., Burke,J.T., Rollin,H., Hammond,J.A., Whisenant,T., Lanigan,C.M., Head,S.R. et al 2004. De novo kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *Am. J. Transplant.* **4**:1776-1785.
98. Morales,J.M. 2005. Immunosuppressive treatment and progression of histologic lesions in kidney allografts. *Kidney Int. Suppl*S124-S130.

8. Anhang

8.1 Danksagung

Nullum officium referenda gratia magis necessarium est (Cicero, De officiis I, 47).

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Mack für die Überlassung dieses Themas und das in mich gesetzte Vertrauen; für seine ständige Ansprechbarkeit in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit, seine stetige fachliche Begleitung und die vielen wertvollen Tipps. Seine Kreativität und zahlreichen Impulse waren stets ein Ansporn. Bedanken möchte ich mich zudem für sein Verständnis und die großen Freiräume in der Schlussphase dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Günter Riegger danke ich für die Möglichkeit, dass ich die vorliegende Dissertation in seinem Labor durchführen konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Richard Warth möchte ich mich für die Betreuung und Begutachtung dieser Dissertation und sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit herzlich bedanken.

Von Herzen danken möchte ich der ganzen „AG Mack“: meine lieben Mitdoktoranden Andrea, Barbara und Manuel, unserem „Post-doc“ Christian sowie den „Mädels“ Kathrin, Nicole und Yvonne. Vielen Dank für die schöne Zeit im Labor, für eure allzeitbereite Hilfe bei großen Aufgaben, für eure Motivation in schwierigeren Zeiten, für den guten Ratsch, den wir dann und wann so hatten... und für eure Freundschaft.

Ein besonderes Dankeschön geht an Kathrin Schmidbauer, die mir von Anfang an tatkräftig unter die Arme gegriffen hat und mich ins Reich der Fibrozyten eingeführt hat. Vielen Dank für die große Geduld beim Anfertigen der vielen Schnitte und ihrer Färbung.

Ein herzlicher Dank gilt allen momentanen und ehemaligen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Innere Medizin II für die gute Zusammenarbeit, die fachliche Hilfe und die offenen Ohren bei verschiedensten kleinen und großen Problemen sowie für die schöne Zeit im H1. Ein besonderer Dank geht dabei an die Laborleiter Dr. Benjamin Stoelcker und Dr. Klaus Stark für ihre Hilfe und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Frank Schweda danke ich für die Einführung in die kleinen und großen Tricks der einseitigen Ureterligatur.

Ein lieber Dank geht an alle meine lieben Mit-Biologen, besonders Lisi und Regina, ohne die meine Zeit in Regensburg nicht halb so schön gewesen wäre. Vielen lieben Dank für die „italienischen Abende“ und eure offenen Ohren für jegliche Laborgeschichten. Dir, liebe Regina, auch vielen Dank für den Unterschlupf, den du mir in der Schlussphase so großzügig gewährt hast und ohne den diese Arbeit nicht so „komplett“ geworden wäre.

Auch meinen lieben „nicht-biologischen“ Freunden sei für ihren Zuspruch gedankt. Euer Rückhalt hat immer sehr gut getan und die Regensburger Zeiten unvergesslich gemacht. Besonders bedanke ich mich hierbei bei Annalena, die es trotz ihres Staatsexamens

geschafft hat, diese Arbeit zu lesen und mit ihren „Rotstift-Augen“ die (hoffentlich) letzten Rechtschreib- und Kommafehler auszumerzen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Schwester und vor allem meinen Eltern für alles, was sie mir in meinem Leben so selbstverständlich ermöglicht haben. Vielen Dank!

Zuletzt danke ich Dirk Heitzmann für seine Motivation und fachlichen Ratschläge, für sein Verständnis und das Zuhören sowie für die Zeit, die er in das Lektorat dieser Arbeit investiert hat. Danke, dass du immer an mich geglaubt hast!

Ein herzliches Dankeschön an alle, die mich auf meinem Weg begleitet, unterstützt und bestärkt haben! Ohne euch würde ich dieses Werk nicht in Händen halten.

8.2 Publikationen

Manuskripte

Niedermeier M, Rodriguez Gomez M, Denzel A, Reich B, Schmidbauer K, Göbel N, Talke Y, Schweda F, Mack M. CD4⁺ T cells control differentiation of monocytes into fibrocytes.

Veröffentlichungen

Brühl H, Cihak J, **Niedermeier M**, Denzel A, Gomez MR, Talke Y, Goebel N, Plachy J, Stangassinger M, Mack M 2009. Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 60(5):1352-1361

Brühl H, Mack M, **Niedermeier M**, Lochbaum D, Schölmerich J, Straub RH 2008. Functional expression of the chemokine receptor CCR7 on fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* 47(12):1771-4

Denzel A, Maus UA, Gomez MR, Moll C, **Niedermeier M**, Winter C, Maus R, Hollingshead S, Briles DE, Kunz-Schughart LA, Talke Y, and M Mack 2008. Basophils enhance immunological memory responses. *Nature Immunology* 9(7):733-42

Brühl H, Cihak J, Plachy J, Kunz-Schughart L, **Niedermeier M**, Denzel A, Rodriguez-Gomez M, Talke Y, Luckow B, Stangassinger M, and M Mack 2007. Targeting of Gr-1⁺, CCR2⁺ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 56(9):2975-85

Posterbeiträge

Niedermeier M, Denzel A, Rodriguez-Gomez M, Schmidbauer K, Göbel N, Mack M 2008. Fibrozyten als Kollagen-produzierende hämatopoietische Zellen in der Nierenfibrose. Kongress für Nephrologie, Tübingen, 27.-30. September 2008

Niedermeier M, Warth R, Mack M 2007. Fibrocytes as collagen-producing hematopoietic cells. 1. Internationales Symposium des Sonderforschungsbereiches 699, Regensburg, 11.-13. Oktober 2007

8.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 22. Juni 2009

(Marianne Niedermeier)